



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di farmacia

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

TESI DI LAUREA

**Analisi proteomica della saliva in  
soggetti alcolisti**

*Relatore:*

Chiar.mo Prof. Antonio Lucacchini

*Correlatore:*

Dott.ssa Laura Giusti

*Candidata:*

Martina Goretti

## INDICE

<b><u>CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE</u></b>	<b>3</b>
<b>1.1 L'ALCOLISMO</b>	<b>3</b>
1.1.1 Neurobiologia e effetti sul SNC	8
1.1.2 Influenza genetica sull'alcolismo	19
1.1.3 Conseguenze fisiopatologiche del consumo di alcol	22
1.1.4 Farmacoterapia	32
<b>1.2 PROTEOMICA</b>	<b>44</b>
1.2.1 L'analisi proteomica nell'alcolismo	48
<b>1.3 LA SALIVA</b>	<b>51</b>
 <b><u>CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI</u></b>	 <b>54</b>
 <b><u>CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI</u></b>	 <b>56</b>
<b>3.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONE</b>	<b>56</b>
<b>3.2 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI</b>	<b>57</b>
<b>3.3 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI</b>	<b>60</b>
<b>3.4 DOSAGGIO PROTEICO</b>	<b>61</b>
<b>3.5 SDS/PAGE E WESTERN BLOT</b>	<b>63</b>
 <b><u>CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE</u></b>	 <b>71</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA</b>	 <b>80</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 L'alcolismo

L'alcol, da sempre conosciuto per la sua capacità di alterazione della psiche, è una droga d'abuso a tutti gli effetti che però a differenza di altre risulta essere così facilmente disponibile e in così tante forme, da non essere comunemente considerato tale. L'alcol è ampiamente accettato dalla società ed è consumato in tutto il mondo come parte integrante di momenti di festa ed aggregazione: il consumo di alcol da lieve a moderato infatti può favorire la socializzazione e la disinibizione, riducendo l'ansia, con conseguente effetto sul comportamento ed i rapporti interpersonali. Essendo così diffuso e socialmente accettato, l'alcol è in questo senso una delle droghe più pericolose tra quelle conosciute.

Con lo “Status report on alcohol and health in 35 European countries 2013”, pubblicato dall'Oms Europa, è emerso che sono gli abitanti dell'UE a detenere il primato del consumo di alcol pro capite a livello globale: i cittadini comunitari (Croazia inclusa) bevono 10,2 litri di alcol puro l'anno pro capite. Una quantità che, se consideriamo anche la Norvegia, la Svizzera e gli altri stati candidati ad entrare nell'UE scende di poco (9,4 litri annui pro capite). Il trend degli ultimi 20 anni, a fronte di una media leggermente in calo, registra un aumento sensibile del consumo pro capite nell'Europa centrale ed orientale, lieve nel nord, una diminuzione moderata nella

zona occidentale e marcata al sud [1]. Anche negli Stati Uniti il consumo di bevande alcoliche è comune, con due terzi degli adulti con età superiore ai 18 anni che hanno consumato bevande alcoliche nell'anno precedente [2].

Avendo l'alcol effetti immediati più miti rispetto ad altre droghe, spesso i consumatori sono portati a pensare che diventarne dipendenti sia molto difficile; in realtà questa, come altre droghe, è in grado di influenzare le vie della gratificazione nel Sistema Nervoso Centrale (SNC), che difficilmente possono essere mantenute sotto il controllo della volontà: il cervello percepisce l'assunzione di alcol come un'attività in grado di dare piacere, portando la persona a richiederne sempre di più. Si arriva quindi ad un punto in cui il consumo di questa sostanza cambia irreversibilmente la neurobiologia cerebrale, che diventa incapace di funzionare normalmente in assenza di alcol. Bisogna tenere però conto del fatto che il semplice consumo di bevande alcoliche non rende la persona dipendente dall'alcool. Il National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism definisce vari livelli di consumo di alcol. Per quanto riguarda il consumo abituale, viene considerato consumo moderato di alcol fino ad un drink al giorno per le donne e due per gli uomini, considerando come "standard drink" una bevanda contenente 14g di alcol puro, di cui alcuni esempi sono riportati in figura 1.1. Viene invece considerato consumo elevato bere 5 o più drinks nella stessa occasione per 5 o più giorni nell'arco di un mese [3].

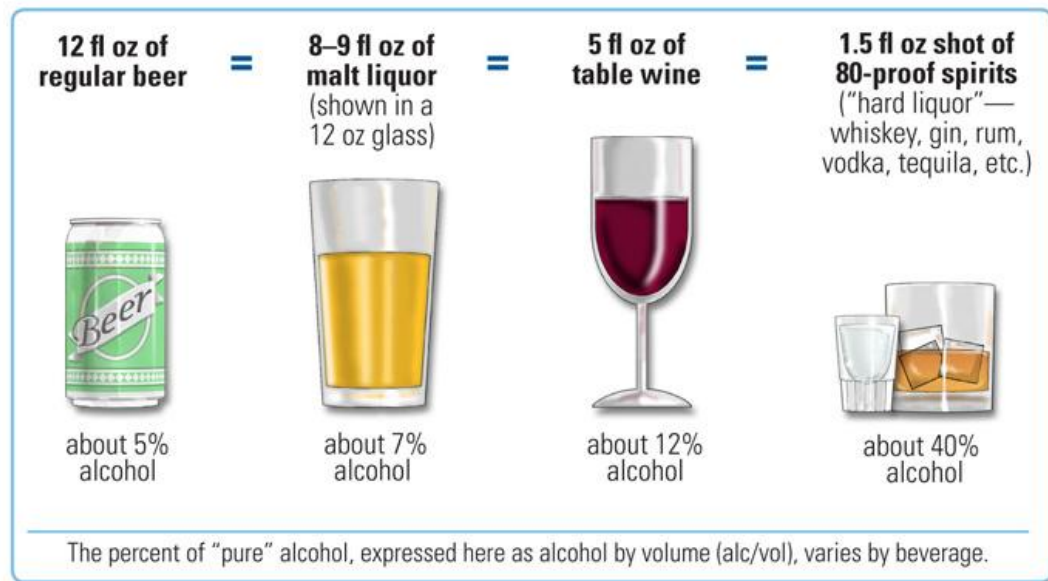


Figura 1. 1 Esempi di "standard drink".

È stato osservato che proprio in caso di consumo elevato un bevitore su quattro sviluppa problemi legati all'alcol, tra cui la dipendenza (AD, Alcohol Dependence) [4].

Per quanto riguarda invece il consumo episodico, si parla di Binge Drinking in caso di consumo elevato di alcol in una singola occasione: questo avviene quando i drinks assunti portano ad un livello ematico di alcol (BAC) pari a 0,08 g/dL, evento che si verifica solitamente dopo 4 drinks per le donne e 5 drinks per gli uomini, nell'arco di 2 ore. The Substance Abuse and Mental Health Service Administration definisce Binge Drinking il consumo di 5 o più bevande alcoliche nella stessa occasione almeno una volta nell'arco di un mese [3].

Quando il problema dell'eccessivo consumo di alcol diventa severo si parla di Alcohol Use Disorders (AUD), in cui i criteri per abuso e dipendenza dall'alcol vengono combinati in un unico termine. La definizione di AUD è fornita dal Diagnostic and Statistical Manual of

Mental Disorders (DSM), che nella sua attuale versione stabilisce che in caso di AUD si ha una situazione di grave impatto sulla salute del soggetto, in quanto nei 12 mesi precedenti si sono presentate almeno due delle 11 condizioni definite:

- consumo di alcol in quantità maggiori o per periodi più lunghi di quanto si volesse;
- incapacità di ridurre il consumo e forte desiderio;
- lunghi periodi di tempo impiegati per procurarsi alcol, consumarlo o riprendersi dai suoi effetti;
- Brama o forte desiderio o urgenza di assumere alcol;
- Incapacità di adempiere ai principali obblighi sul lavoro, a scuola o a casa, a causa del ripetuto consumo di alcol;
- Persistenza nel consumo dell'alcol nonostante questo abbia causato o aggravato problemi sociali o interpersonali;
- Rinuncia o riduzione di importanti attività ricreative, sociali o occupazionali a causa dell'alcol;
- Ricorrente uso di alcol in situazioni in cui risulta essere pericoloso;
- Persistenza nel consumo di alcol nonostante la consapevolezza che questa abbia causato o aggravato problemi fisici e psicologici;
- Tolleranza;
- Astinenza.

La diagnosi dell'alcolismo viene effettuata mediante questionari mirati a verificare comportamenti nei confronti dell'alcol, che sono

accertati come dannosi. Nella figura seguente viene effettuato un confronto tra i criteri per la diagnosi dell'AUD nell'attuale DSM (5) e nella sua versione precedente (IV).

DSM-IV		DSM-5	
Any 1 = ALCOHOL ABUSE	Recurrent alcohol use resulting in a failure to fulfill major role obligations at work, school, or home (e.g., repeated absences or poor work performance related to alcohol use; alcohol-related absences, suspensions, or expulsions from school; neglect of children or household).	1 Alcohol is often taken in larger amounts or over a longer period than was intended. (See DSM-IV, criterion 7.)	
	Recurrent alcohol use in situations in which it is physically hazardous (e.g., driving an automobile or operating a machine when impaired by alcohol abuse).	2 There is a persistent desire or unsuccessful efforts to cut down or control alcohol use. (See DSM-IV, criterion 8.)	
	Recurrent alcohol-related legal problems (e.g., arrests for alcohol-related disorderly conduct). <b>**This is not included in DSM-5**</b>	3 A great deal of time is spent in activities necessary to obtain alcohol, use alcohol, or recover from its effects. (See DSM-IV, criterion 9.)	
	Continued alcohol use despite having persistent or recurrent social or interpersonal problems caused or exacerbated by the effects of the alcohol (e.g., arguments with spouse about the consequences of intoxication, physical fights).	4 Craving, or a strong desire or urge to use alcohol. <b>**This is new to DSM-5**</b>	
Any 3 = ALCOHOL DEPENDENCE	Tolerance, as defined by either of the following: a) A need for markedly increased amounts of alcohol to achieve intoxication or desired effect b) Markedly diminished effect with continued use of the same amount of alcohol	5 Recurrent alcohol use resulting in a failure to fulfill major role obligations at work, school, or home. (See DSM-IV, criterion 1.)	The presence of at least 2 of these symptoms indicates an <b>Alcohol Use Disorder (AUD)</b> .  The severity of the AUD is defined as: <b>Mild:</b> The presence of 2 to 3 symptoms <b>Moderate:</b> The presence of 4 to 5 symptoms <b>Severe:</b> The presence of 6 or more symptoms
	Withdrawal, as manifested by either of the following: a) The characteristic withdrawal syndrome for alcohol b) Alcohol is taken to relieve or avoid withdrawal symptoms	6 Continued alcohol use despite having persistent or recurrent social or interpersonal problems caused or exacerbated by the effects of alcohol. (See DSM-IV, criterion 4.)	
	Alcohol is often taken in larger amounts or over a longer period than was intended.	7 Important social, occupational, or recreational activities are given up or reduced because of alcohol use. (See DSM-IV, criterion 10.)	
	There is a persistent desire or unsuccessful efforts to cut down or control alcohol use.	8 Recurrent alcohol use in situations in which it is physically hazardous. (See DSM-IV, criterion 2.)	
	A great deal of time is spent in activities necessary to obtain alcohol (e.g., driving long distances), use alcohol, or recover from its effects.	9 Alcohol use is continued despite knowledge of having a persistent or recurrent physical or psychological problem that is likely to have been caused or exacerbated by alcohol. (See DSM-IV, criterion 11.)	
	Important social, occupational, or recreational activities are given up or reduced because of alcohol use.	10 Tolerance, as defined by either of the following: a) A need for markedly increased amounts of alcohol to achieve intoxication or desired effect b) A markedly diminished effect with continued use of the same amount of alcohol (See DSM-IV, criterion 5.)	
	Alcohol use is continued despite knowledge of having a persistent or recurrent physical or psychological problem that is likely to have been caused or exacerbated by the substance (e.g., continued drinking despite recognition that an ulcer was made worse by alcohol consumption).	11 Withdrawal, as manifested by either of the following: a) The characteristic withdrawal syndrome for alcohol (refer to criteria A and B of the criteria set for alcohol withdrawal) b) Alcohol (or a closely related substance, such as a benzodiazepine) is taken to relieve or avoid withdrawal symptoms. (See DSM-IV, criterion 6.)	

Figura 1. 2 Confronto tra DSM-IV e DSM-5 riguardante i criteri per la diagnosi dell'AUD.

### 1.1.1 Neurobiologia dell'alcolismo e effetti sul SNC

L'alcol, come tutte le droghe, è in grado di influenzare l'attività del SNC e i suoi effetti, acuti e cronici, sulla fisiologia cerebrale sono molto studiati, anche per approfondire la ricerca relativa all'uso di farmaci psicotropi per il trattamento dell'AUD.

Parlando di alcol, ci si riferisce all'etanolo (figura 1.3), che può essere facilmente consumato sottoforma di varie bevande alcoliche che ne contengono differenti percentuali.

L'etanolo agisce deprimendo le funzioni cerebrali in maniera simile ad un anestetico; a basse concentrazioni ematiche favorisce il rilassamento,

la socializzazione e porta a comportamenti normalmente inibiti, ma allo stesso tempo è in

grado anche di alterare la capacità dell'ippocampo di elaborare informazioni, ostacolando ad esempio il processo di memorizzazione.

Ad alte dosi invece si può arrivare all'intossicazione, con ad esempio perdita reversibile della capacità di coordinazione dei movimenti e di giudizio.

L'abuso di alcol a lungo termine porta a cambiamenti nella fisiologia cerebrale, instaurando ad esempio tolleranza e dipendenza fisica. Tali cambiamenti determinano quindi l'incapacità per l'alcolista di cessare il consumo di alcol e in caso di interruzione nell'assunzione sfociano

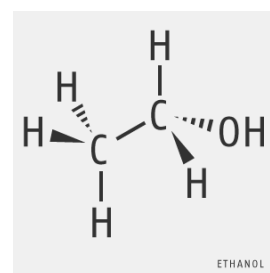


Figura 1.3 Struttura dell'etanolo.



nella sindrome d'astinenza (ASW, alcohol withdrawal syndrome). L'alcolista diventa quindi consapevole del danno fisico determinato dall'alcol, ma non è in grado di reagire all'impulso compulsivo a bere [5].

L'alcolismo, ovvero la dipendenza fisica dall'alcol, si sviluppa principalmente attraverso due vie: un rinforzo positivo ed un rinforzo negativo. Il rinforzo è un processo in cui una risposta o un comportamento è rafforzato sulla base di una precedente esperienza. Nel rinforzo positivo gli effetti indotti dall'alcol, come l'euforia, vanno a costituire uno stimolo di gratificazione, stimolando nel soggetto una risposta che si traduce nella maggiore richiesta di alcol. Nel rinforzo negativo invece l'aumento nel consumo di alcol è dato dalla possibilità di evitare così esperienze negative, come i sintomi dell'astinenza, tra cui irascibilità, ansia e disforia.

A segnare questo passaggio verso la dipendenza vera e propria, è infatti la diffusione di fenomeni di adattamento dei neuroni cerebrali, come risultato

dell'esposizione prolungata ad elevate quantità di alcol: questo fa sì che il soggetto sia influenzato sia dal rinforzo positivo che da quello negativo, mentre quando il soggetto è nelle fasi precoci, in cui non si ha dipendenza, l'influenza è

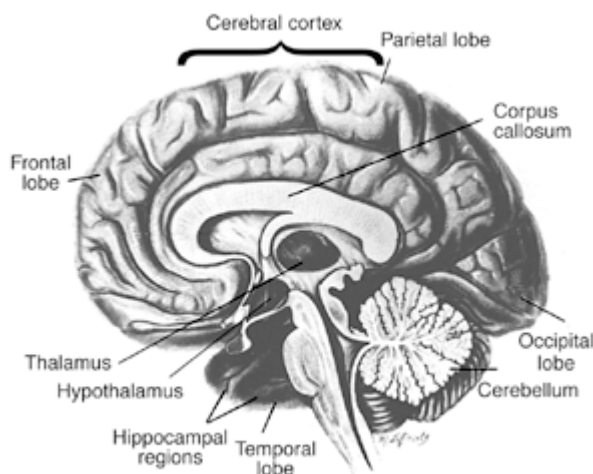


Figura 1.4 Rappresentazione schematica del cervello umano con, in evidenza, le aree maggiormente vulnerabili all'alcolismo.

data esclusivamente dall'impulso positivo [6].

Questi fenomeni di adattamento dei neuroni sono causati da tutta una serie di processi, tra cui distinguiamo sensibilizzazione, tolleranza e astinenza [7].

- La sensibilizzazione è un fenomeno utilizzato solitamente per descrivere la dipendenza da droghe diverse dall'alcol, ma è stato osservato come nei topi l'attività locomotoria sia incrementata dall'effetto dell'alcol e vada nel tempo incontro a sensibilizzazione, in seguito all'esposizione ripetuta, suggerendo un ruolo di questo processo nello sviluppo di dipendenza.
- L'esposizione cronica all'alcol determina lo sviluppo di tolleranza nei confronti dei suoi effetti funzionali e metabolici: quando questo avviene l'individuo richiede una sempre maggiore quantità di etanolo per riprodurre gli stessi effetti ottenuti precedentemente a dosi inferiori.
- Si ha astinenza quando, in seguito ad un'esposizione cronica all'alcol, l'interruzione nell'assunzione porta a tutta una serie di sintomi che determinano un aumento del bisogno di ingerire la sostanza. I sintomi, che risultano essere simili tra le varie specie, persistono fino a 48 ore in seguito all'interruzione dell'assunzione. Si presenteranno convulsioni, anormalità motorie e del sistema nervoso autonomo (sudorazione, alterazione del ritmo cardiaco, irrequietezza), ansia, disforia e irritabilità, sintomo che compare precocemente e che

solitamente persiste per lunghi periodi. Tali sintomi favoriscono la tendenza alla ricaduta e ai tentativi di ottenere la sostanza [25].

I fenomeni di adattamento coinvolgono vari circuiti nervosi e differenti neurotrasmettitori. Un circuito nervoso è una struttura che comprende tutta una serie di neuroni che comunicano tra loro mediante segnali elettrochimici. Il neurone attivato, in particolare, invia molecole di segnale, dette neurotrasmettitori, che trasmettono tale segnale ad altre cellule nervose, mediante l'interazione con molecole chiamate recettori. A seconda dei casi, il segnale trasmesso attraverso il circuito nervoso potrà essere eccitatorio o inibitorio. L'alcol interagisce con diversi sistemi neuronali che fanno parte delle vie cerebrali dello stress e della gratificazione ed in seguito ad un consumo cronico può determinare a questo livello alterazioni funzionali che conducono poi all'alcolismo. I circuiti nervosi coinvolti sono principalmente il dopaminergico, il serotoninergico, il glutammatergico e il GABAergico [5].

### **Via dopaminergica:**

La dopamina è un importante neurotrasmettitore coinvolto nel meccanismo di gratificazione e quindi nello sviluppo della dipendenza dall'alcol. Fa parte della classe delle catecolammine (classe di molecole che agiscono come neurotrasmettitori e ormoni) ed è in particolare una monoammina (composto contenente nella sua struttura Azoto, ottenuto a partire dall'ammoniaca in seguito alla sostituzione

di uno o più atomi di Idrogeno con idrocarburi radicalici). Costituisce inoltre un precursore di adrenalina e noradrenalina [5].

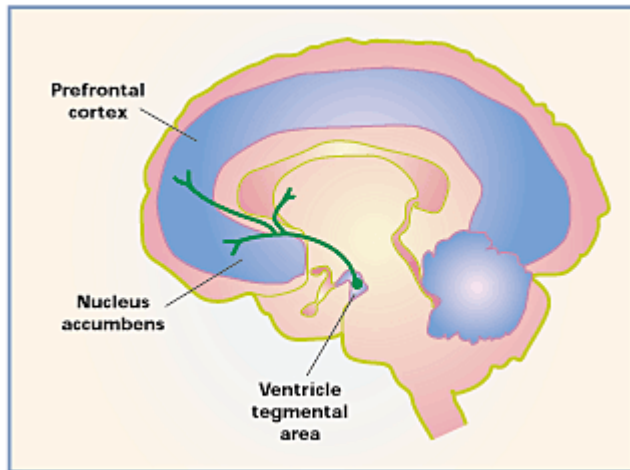


Figura 1. 5 La via dopaminergica.

Come altre sostanze in grado di indurre dipendenza, l'alcol può stimolare il rilascio del neurotrasmettitore dopamina da parte di cellule che originano nella regione cerebrale chiamata zona tegmentale centrale (VTA, ventral tegmental area) che è parte della via mesolimbica dopaminergica, via associata al comportamento, alla gratificazione e alla reazione dell'organismo a cambiamenti ambientali. Il rilascio di dopamina nel nucleo accumbens e nella corteccia prefrontale porta all'incremento del consumo di alcol o a rendere tale esperienza più importante [4]. Studi hanno infatti dimostrato che il consumo di alcol può essere bloccato iniettando direttamente nel nucleo accumbens sostanze che interferiscono con la normale attività dopaminergica (come antagonisti dopaminergici) [8,9].

È stato inoltre osservato che il consumo di alcol, o anche semplicemente la consapevolezza della disponibilità di alcol, porta

alla liberazione di dopamina nel nucleo accumbens: si osserva infatti un aumento dei livelli di dopamina nel fluido extracellulare che circonda questi neuroni [10].

Quello dopaminergico però non è l'unico sistema coinvolto nel rafforzamento del consumo di alcol, nonostante sia molto importante il ruolo svolto in questo processo: infatti apportare lesioni al sistema mesolimbico non porta ad un'abolizione del consumo di alcol [11].

È stato poi osservato che l'astinenza dall'alcol determina una riduzione delle funzioni dopaminergiche nei soggetti dipendenti, evento che contribuisce ai sintomi dell'astinenza e al rischio di ricadute [12]. È stato infatti descritto come i neuroni del sistema mesolimbico siano coinvolti nell'apprendimento basato sulla gratificazione e nello sviluppo di dipendenza [13].

Considerato che l'alcol non sembra legare selettivamente i recettori dopaminergici, i suoi effetti sul rilascio di dopamina sono mediati probabilmente dall'interazione con altri sistemi neuronali, come quello glutammatergico, GABAergico, serotoninergico, così come tramite l'interazione col sistema oppioide endogeno [14].

### **Via Serotoninergica:**

Un altro neurotrasmettitore influenzato da numerose droghe d'abuso, tra cui cocaina, amfetamine, LSD e anche l'alcol, è la serotonina, anche conosciuta come 5-idrossitriptamina (5-HT, 5-hydroxytryptamine). Si tratta di una monoammina ottenuta a partire dal triptofano e prodotta dai neuroni nel nucleo del raphe; questi sono

in grado di liberarla in quasi tutta l'area cerebrale, così come a livello spinale.

La serotonina partecipa a diversi processi cerebrali, tra cui quelli relativi alla regolazione della temperatura corporea, al sonno, all'umore, all'appetito e al dolore. È inoltre coinvolta in alcune funzioni cognitive, tra cui l'apprendimento e la memoria. Alterazioni di questa via possono determinare disturbo ossessivo-compulsivo, ansia e depressione: la maggior parte dei farmaci antidepressivi agiscono infatti proprio sul sistema serotoninergico, incrementando i livelli e l'attività di questo neurotrasmettitore [5]. La via serotoninergica costituisce da molto tempo un target di forte interesse anche per un potenziale trattamento farmacologico dell'alcolismo, dato il dimostrato legame tra la deplezione di serotonina, l'impulsività e l'assunzione di alcol nel ratto e nell'uomo [15].

Secondo uno studio [16] farmaci che agiscono sul sistema serotoninergico, inibendo il re-uptake del neurotrasmettitore (prolungandone quindi l'attività) o bloccando determinati sottotipi recettoriali,

risultano

sopprimere il  
consumo elevato  
di alcol nei ratti.

Nell'astinenza  
inoltre il rilascio  
di serotonina dal  
nucleo

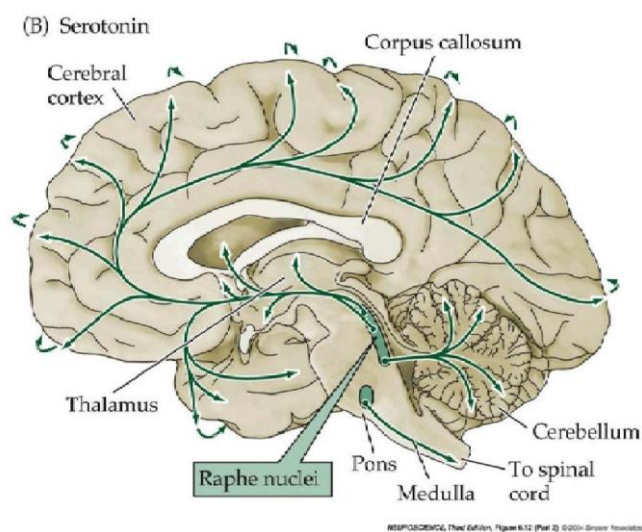


Figura 1.6 La via serotoninergica.

accumbens è soppresso e questa situazione viene parzialmente rovesciata mediante l'auto-somministrazione di alcol [17].

### **Via GABAergica:**

GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico) è il principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC ed esercita la propria funzione mediante l'interazione con due sottotipi recettoriali, GABAA e GABAB. La sua attività è incrementata dall'alcol, con conseguente aumento degli effetti inibitori, attraverso due meccanismi, uno presinaptico ed uno postsinaptico. A livello presinaptico l'alcol determina un aumento del rilascio di GABA, mentre a livello postsinaptico facilita la sua attività sui recettori GABAA [5].

Si può ottenere infatti un'interruzione del consumo di alcol utilizzando composti in grado di interferire con l'attività dei recettori GABAA (ad esempio antagonisti di tali recettori) oppure di stimolare i GABAB a livello di nucleo accumbens e amigdala [18].

Tra queste regioni, il nucleo centrale dell'amigdala è in particolare coinvolto nella componente emotiva, e risulta essere molto sensibile a composti ad attività GABAergica per l'interruzione dell'assunzione di alcol [19]. Inoltre è stato osservato che l'esposizione acuta o cronica all'alcol incrementa la trasmissione GABAergica a questo livello [20].

L'iniezione diretta nel pallido centrale (una regione che riceve segnali dai neuroni dell'amigdala) di sostanze che agiscono sulla subunità  $\alpha_1$  dei recettori GABAA, aiuta a ridurre il consumo di alcol [21].

I sistemi GABAergici saranno quindi alterati in caso di esposizione cronica all'alcol: in alcune regioni cerebrali per esempio in tali situazioni si ha un'influenza sull'espressione del gene che codifica per componenti del recettore GABAA; si osserva in particolare una variazione della composizione di tali recettori in queste regioni, con una riduzione delle subunità  $\alpha_1$  ed un aumento delle  $\alpha_4$  [22].

Un altro aspetto riguarda poi gli steroidi neuroattivi: si tratta di molecole prodotte sia a livello centrale che nella periferia che possono regolare le funzioni dei recettori GABAA. In caso di esposizione all'alcol si osserva un marcato aumento dei livelli di steroidi neuroattivi, senza che questo dipenda dalla produzione periferica. Questi elementi indicano quindi che tali molecole sono potenziali modulatori delle alterazioni GABAergiche che si verificano nello sviluppo della dipendenza da alcol, mediante una loro azione diretta sui recettori GABAA [23].

Le alterazioni del sistema GABAergico sono responsabili dell'effetto ansiogeno e di tutta una serie di sintomi negativi che si presentano nell'Alcohol Withdrawal Syndrome (AWS) e che possono persistere per lunghi periodi di tempo in seguito all'interruzione dell'assunzione di alcol; ovviamente questa situazione può portare al desiderio di alleviare l'ansia e le altre sensazioni negative, con conseguente tendenza alle ricadute e ad assumere un comportamento compulsivo e ripetitivo che si traduce nella dipendenza.



## Via Glutammatergica:

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio cerebrale ed esercita i propri effetti mediante l'interazione con diversi sottotipi recettoriali, tra cui i recettori NMDA (N-metil-D-aspartato).

Il sistema glutammatergico è coinvolto nelle azioni di rafforzamento acuto dell'alcol, che in particolare ne riduce l'attività: contrariamente a quanto avviene per il GABA infatti, l'alcol determina una riduzione dei livelli extracellulari di glutammato, in una regione cerebrale detta striatum, che comprende varie strutture, tra cui il nucleo accumbens [24]. L'effetto dell'alcol sull'organismo può essere infatti imitato da farmaci antagonisti dei recettori NMDA [25].

Il segnale mediato dal glutammato a livello del nucleo centrale dell'amigdala è soppresso in seguito alla somministrazione acuta di alcol, con effetti aumentati in caso di esposizione cronica [26].

L'alterazione della trasmissione glutammatergica è molto probabilmente legata ad alterazioni funzionali riguardanti sia i recettori NMDA sia un altro sottotipo recettoriale, conosciuto come sottotipo 5 del recettore metabotropico glutammatergico [27, 28].

Un aspetto di cui si deve tenere conto è il coinvolgimento dei recettori NMDA nel fenomeno della neuroplasticità, un processo di riorganizzazione delle cellule nervose che probabilmente contribuisce allo sviluppo di ipereccitabilità e brama durante

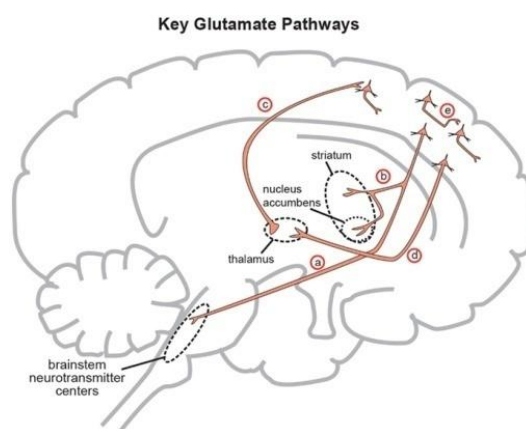


Figura 1. 7 La via glutammatergica.

l'astinenza dall'alcol [29]. In particolare la plasticità delle sinapsi glutammatergiche sui neuroni dopaminergici esiste in varie forme e può regolare l'influenza della droga e di eventi ad essa correlati sulla vulnerabilità a sviluppare dipendenza [13].

L'alcol è in grado quindi di alterare il bilanciamento tra sistema glutammatergico e GABAergico, determinando uno stato di ipereccitabilità che si manifesta durante l'astinenza, contribuendo ai sintomi dannosi dell'AUD. Esistono strategie farmacologiche per il trattamento dell'AUD che si basano sulla correzione del bilanciamento tra vie eccitatorie e vie inibitorie, allo scopo di alleviare il desiderio intenso di assumere alcol, determinato dai fenomeni di adattamento neuronale. Altra strategia consiste invece nell'agire sulle vie della gratificazione, in modo da compensare la plasticità nel segnale dopaminergico, che stimola l'assunzione di alcol nei pazienti affetti da AUD.

Nonostante l'aumentata consapevolezza dei disturbi neurobiologici determinati dall'assunzione abituale di alcol, non si è ancora riusciti a stabilire una causa eziologica comune per l'AUD. A rendere difficile la ricerca di trattamenti farmacologici che siano efficaci per le diverse popolazioni di pazienti è anche la complessa interazione tra fattori ambientali e genetici che possono predisporre l'individuo allo sviluppo di AUD [30].

## **1.1.2 Influenza genetica sull'alcolismo**

È stato osservato che la dipendenza dall'alcol è influenzata anche da fattori genetici, oltre che da fattori ambientali, e che in particolare i geni coinvolti lo sono anche nei sistemi dopaminergico, serotoninergico, GABAergico e glutammatergico. La presenza di questi geni non permette di stabilire se il soggetto diventerà dipendente dall'alcol, ma sicuramente esiste una correlazione tra questi geni e l'alcolismo [5].

Oltre a geni che incrementano il rischio di sviluppare alcolismo, esistono anche geni in grado di ridurre tale rischio, direttamente o indirettamente: ad esempio alcuni soggetti di origine asiatica presentano una variante genica che determina un'alterazione nella velocità di metabolismo dell'alcol, provocando sintomi come nausea, vampate di calore e aumento del ritmo cardiaco quando bevono, e portando quindi ad evitare il consumo di alcol, con conseguente protezione dall'alcolismo [38].

### **Via dopaminergica:**

Nell'ambito del sistema dopaminergico uno di questi geni è il DRD2 che codifica per il recettore dopaminergico D2 e che è localizzato sul cromosoma 11 (q22-q23).

DRD2 è un recettore accoppiato a proteina G, localizzato sui neuroni dopaminergici postsinaptici e coinvolto in maniera centrale nelle vie mesolimbiche della gratificazione; il segnale trasmesso attraverso questi recettori governa funzioni fisiologiche correlate alla

locomozione, alla produzione di ormoni e all'abuso di droghe. È stato osservato che il gene che codifica per questo recettore è associato all'aumento del consumo di alcol nei pazienti alcolisti [31].

Il gene DRD2 presenta tre polimorfismi (variazioni comuni della sequenza di DNA tra gli individui):

- 141c ins/del
- Taq1B
- Taq1A

Gli alleli 141c ins/del e Taq1A sono implicati in un maggior rischio di sviluppare l'alcolismo; in particolare al polimorfismo Taq1A è stato anche associato l'uso problematico di droghe e alcol tra gli adolescenti e un incremento della mortalità dei pazienti alcolisti per un periodo di 10 anni. I pazienti che portano questo allele, rispetto agli altri, sviluppano disturbi più severi, nell'ambito di un range che comprende vari livelli di problemi associati al bere. Tale allele può inoltre costituire un marker dell'alcolismo familiare maschile. Nonostante queste correlazioni alcuni studi hanno portato a risultati ancora contraddittori, che risultano essere ancora maggiori nel caso dell'allele 141c ins/del [5].

Il polimorfismo di singolo nucleotide (SNP) Taq1B è stato raramente studiato per la sua associazione con l'AD e con risultati contrastanti. È stata tuttavia riportata un'associazione tra il polimorfismo Taq1B e l'età precoce di inizio di assunzione dell'alcol [32].

### **Via GABAergica:**

Si è a conoscenza dell'influenza del consumo di alcol sul neurotrasmettitore GABA. Recentemente due sottotipi dei recettori GABAA hanno permesso di studiare una possibile predisposizione genetica all'alcolismo. Questi sono il recettore GABAA  $\alpha 1$  (GABRA1) ed il recettore GABAA  $\alpha 6$  (GABRA6), i cui geni sono localizzati sul cromosoma 5. Secondo uno studio [33] è stata trovata una forte correlazione tra il genotipo di GABRA1 e l'alcolismo, la storia di svenimenti, l'età della prima ubriacatura così come il livello di risposta all'alcol.

Un altro studio effettuato sulla popolazione coreana [34] ha trovato un'associazione tra i polimorfismi genetici dei recettori GABAA  $\alpha 1$  e GABAA  $\alpha 6$  e lo sviluppo dell'alcolismo, oltre ad aver osservato che il genotipo GG del gene per il recettore GABAA  $\alpha 1$  svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'alcolismo di tipo severo e precoce. Un altro studio condotto sulla popolazione taiwanese Han ha portato a simili risultati [35].

Tuttavia anche in questo caso non tutti gli studi hanno portato a risultati favorevoli: ad esempio lo studio di Song J. e collaboratori [36] non ha trovato alcuna associazione tra i geni codificanti GABRA1 e GABRA6 e l'alcolismo.

### **Via Glutammatergica:**

Sono stati fatti diversi studi riguardanti il coinvolgimento di questo sistema nello sviluppo dell'AD, tra i quali uno dei più recenti ha trovato un'associazione tra l'alcolismo e un polimorfismo del

promoter del gene che codifica per una subunità del recettore glutammatergico: gli alleli corti sono risultati infatti significativamente meno frequenti nei pazienti alcolisti [37].

La ricerca sta anche valutando come i geni possano influire sull'efficacia dei trattamenti dell'alcolismo. Ad esempio il farmaco Naltrexone aiuta soltanto alcuni pazienti a ridurre il consumo di alcol: è stato osservato che a rispondere positivamente a questo farmaco sono coloro che presentano varianti su uno specifico gene, in particolare l'allele G del polimorfismo A118G del gene per il recettore oppioide  $\mu$  (OPRM1) [38].

Una maggiore consapevolezza su come i geni influiscano sul trattamento dell'alcolismo potrà aiutare i medici nella scelta dei farmaci più adeguati per ciascun paziente.

### **1.1.3 Conseguenze fisiopatologiche del consumo di alcol:**

Anche in soggetti altrimenti in salute, il consumo di alcol a dosi superiori a uno-due drinks al giorno determina tossicità per la maggior parte degli organi; l'esposizione all'alcol a lungo termine poi aumenta il rischio di danno a livello dei sistemi gastrointestinale, cardiocircolatorio, immunitario, nervoso, e altri [4]. Alcuni di questi

effetti sono dovuti all'alcol stesso, altri al suo principale metabolita, l'acetaldeide.

Le possibili vie metaboliche per l'etanolo sono le seguenti:

1.  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalasi}} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}$
2.  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NADPH} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{MEOS}^*} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}$
3.  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{alcol deidrogenasi}} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}$

\*sistema micorsomiale di ossidazione dell'etanolo.

Solo il 10% della via 2 è presente negli epatociti [39].

La tossicità cellulare legata al consumo di alcol può essere avviata dall'acetaldeide, che può danneggiare le proteine intracellulari ed indurre la morte della cellula per apoptosi. Inoltre a seguito del massiccio metabolismo dell'etanolo, si può avere un'alterazione dello stato ossido-riduttivo cellulare, con conseguente impatto sulla respirazione cellulare e sul metabolismo dei grassi sia nell'uomo che nell'animale.

### **Tossicità gastrointestinale:**

A livello gastrointestinale il danno indotto dall'alcol è il risultato di un effetto tossico diretto e della deficienza alimentare che accompagna solitamente l'eccessivo consumo di bevande alcoliche: essendo l'etanolo altamente calorico (7,1 kcal/g), spesso l'alcolista è spinto ad utilizzarlo come unica fonte alimentare. Oltre a questo, l'etanolo influisce sul tempo di svuotamento gastrico, sulla funzionalità e sulla morfologia dell'intestino tenue e sulle secrezioni epatica e biliare. Il consumo cronico di alcol determina una sindrome di

malassorbimento, con riduzione dell'assorbimento della tiamina, riduzione della circolazione entero-epatica del folato e alterazioni metaboliche delle vitamine A e D.

L'etanolo può favorire il sanguinamento gastrointestinale, mediante l'infiammazione dell'esofago e dello stomaco o mediante il vomito, che può danneggiare la mucosa.

La pancreatite acuta è più frequente negli alcolisti che nel resto della popolazione e può portare ad un danno cronico o al cancro pancreatico, a seguito dell'esposizione prolungata.

A livello epatico il danno si manifesta con epatomegalia ed aumento delle transaminasi sieriche (ALT, AST). A seguito dell'assunzione cronica si ha epatite alcolica acuta, con vomito, diarrea, ittero e disturbi psichici; si presenta poi un ingrossamento del fegato (fegato grasso o steatosi) per infiltrazione dei lipidi, che si accumulano a questo livello a seguito della minore ossidazione degli acidi grassi e di altre alterazioni metaboliche. Si ha inoltre edema delle cellule epatiche e accumulo di proteine. Per una certa percentuale di casi questa situazione degenera in cirrosi epatica, che risulta fatale.

Per cirrosi si intende un'alterazione morfologica cronica del fegato, caratterizzata dalla presenza di tranci connettivali che alterano la normale struttura epatica, con la comparsa di aggregati cellulari sottoforma di noduli e conseguente alterazione del flusso ematico e degli scambi intercellulari. Il tessuto fibrotico si accumula a seguito di insulti tossici ripetuti, che portano alla morte delle cellule epatiche e quindi al richiamo di fibroblasti a seguito del processo infiammatorio, con conseguente accumulo delle fibre di collagene e fibrosi. Questo



rende difficoltoso il ripristinarsi del tessuto epatico sano. Il conseguente blocco del flusso sanguigno porta ad ipertensione portale, che viene temporaneamente risolta con l'attivazione di deviazioni del flusso sanguigno ma che si aggrava comunque nel tempo, fino a causare emorragie interne.

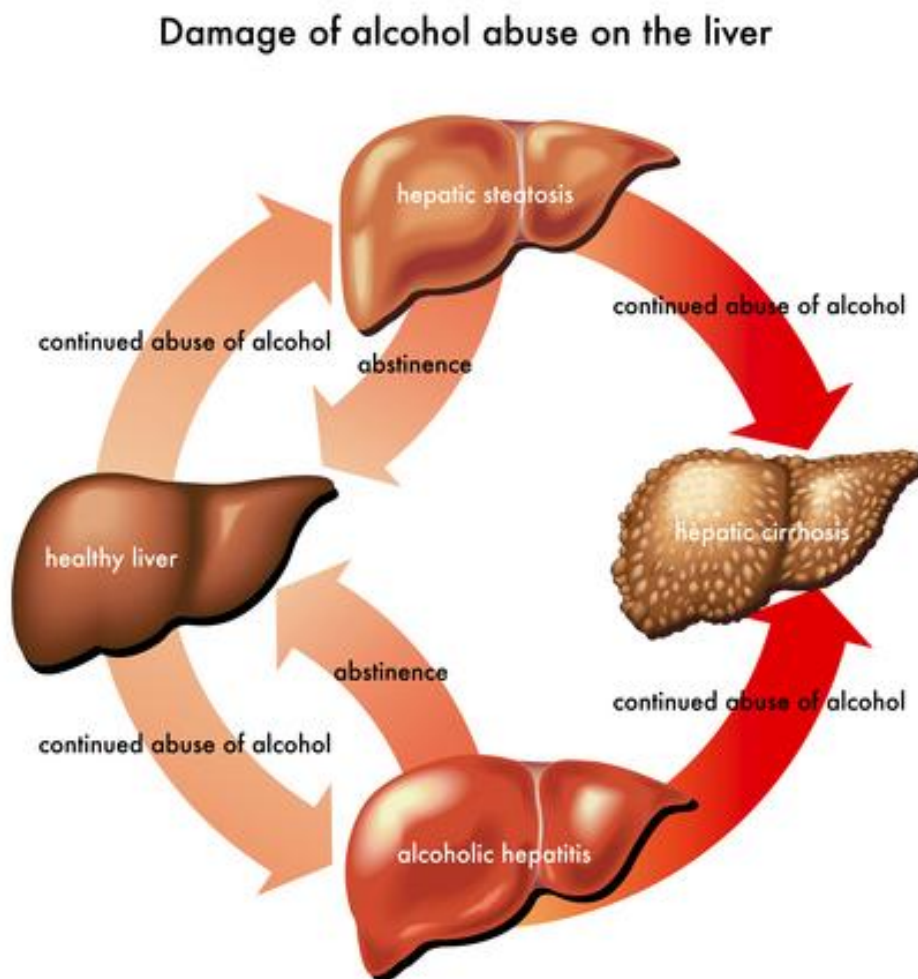


Figura 1. 8 Effetti dannosi dell'abuso di alcol sul fegato.

Ad oggi non si sa per certo se l'etanolo induca cirrosi per un effetto tossico diretto o a seguito della deficienza nutrizionale associata all'alcolismo: è stato osservato infatti che una dieta carente in colina, proteine, metionina, vitamina B<sub>2</sub> ed acido folico favorisce lo sviluppo di cirrosi e che la somministrazione integrata di questi nutrienti sembra annullare l'effetto dell'uso prolungato di etanolo; allo stesso tempo si è anche osservato però che la somministrazione di dosi massicce di etanolo nei babbuini, in condizioni nutrizionali appropriate, provoca comunque cirrosi [4, 39].

### **Tossicità cardiovascolare:**

A livello cardiovascolare il consumo di alcol da lieve a moderato (uno o due drinks al giorno) può determinare vasodilatazione periferica e riduzione della contrattilità cardiaca, con conseguente lieve riduzione della pressione ematica [40]. In questi casi si può anche ottenere un effetto di cardioprotezione, a seguito di variazioni nel processo di coagulazione o all'aumento delle lipoproteine ad alta densità (HDL) [41].

Il consumo di 3 o più drinks al giorno invece può favorire lo sviluppo di ipertensione da lieve a moderata e un incremento del rischio di danno delle arterie coronarie e cardiomiopatia.

Il consumo elevato di alcol può portare al danneggiamento del ventricolo sinistro, aritmia ed insufficienza cardiaca, come risultato della limitata contrattilità del muscolo cardiaco.

In caso di Binge drinking si possono presentare aritmie atriali o ventricolari, anche in soggetti che non presentano altri disturbi cardiaci, una sindrome conosciuta come “holiday heart” [42].

### **Tossicità neurologica:**

L'alcol ha una notevole tossicità neurologica. Alcuni effetti possono manifestarsi già dopo uno o due drinks, per poi risolversi rapidamente una volta interrotta l'assunzione (ad esempio difficoltà nella locomozione e nella parola, rallentamento della velocità di reazione, disturbi della memoria), mentre altri, conseguenti all'elevato e protratto consumo di alcol, possono persistere per periodi di tempo più lunghi. Le conseguenze neurologiche del consumo di alcol dipendono da vari fattori, tra cui quanto e quanto spesso il soggetto beve, l'età della prima assunzione di alcol, da quanto tempo consuma alcol, ecc. [48]

I pazienti alcolisti possono soffrire di neuropatia periferica, caratterizzata da formicolio e intorpidimento, specialmente a mani e piedi.

La tossicità dell'alcol può inoltre portare ad atrofia del cervelletto, con conseguente sindrome neurologica che può influire sull'andatura e sulla postura, spesso accompagnata da nistagmo (movimenti oscillatori ritmici ed involontari dei bulbi oculari).

Meno comuni sono sindromi neurologiche causate non direttamente dall'alcol, ma da uno stato di salute precario, che determina anche ad esempio carenza di tiamina, secondaria all'alcolismo. La tiamina, conosciuta anche come vitamina B<sub>1</sub>, che possiamo trovare in vari

alimenti, tra cui carne, pollame, piselli, semi di soia e nocciole, è un nutriente essenziale per tutto l'organismo, la cui carenza si presenta in fino all'80% dei pazienti alcolisti. In questa situazione alcuni di questi pazienti possono sviluppare una sindrome neurologica, chiamata sindrome di Wernicke-Korsakoff (WKS), che consiste in due sindromi separate: la prima è una fugace e severa condizione detta encefalopatia di Wernicke, mentre la seconda è una condizione lunga e debilitante, chiamata psicosi di Korsakoff.

I sintomi dell'encefalopatia di Wernicke comprendono confusione mentale, paralisi dei nervi oculomotori e difficoltà nella coordinazione dei movimenti muscolari; non sempre la diagnosi è semplice, in quanto non tutti i pazienti presentano la totalità dei sintomi. 80-90% dei soggetti alcolisti che soffrono di questa encefalopatia sviluppano anche la psicosi di Korsakoff, caratterizzata da continui problemi di apprendimento e memoria, con in particolare amnesia retrograda (difficoltà a recuperare informazioni passate) e anterograda (difficoltà a memorizzare nuove informazioni) [49]. Questi disturbi sono legati ad un danno del cervelletto, che risulta essere particolarmente sensibile alla carenza di tiamina e spesso danneggiato nei pazienti alcolisti.

Per quanto riguarda il trattamento della WKS la somministrazione di tiamina nelle fasi più precoci aiuta a migliorare le funzioni cerebrali [4, 48].

Le disfunzioni epatiche causate dall'eccessivo consumo di alcol, come la cirrosi, possono portare anche a danni cerebrali, in particolare all'encefalopatia epatica, potenzialmente fatale. Questo disordine

cerebrale può provocare alterazioni del sonno, dell'umore e della personalità, ansia, depressione, disturbi cognitivi, problemi di coordinazione, fino ad arrivare al coma epatico, che può essere fatale. Alcuni studi hanno osservato come almeno due sostanze, l'ammoniaca ed il Manganese, svolgano un ruolo importante nello sviluppo di questa patologia, con in particolare le cellule epatiche danneggiate dall'alcol, che permettono a elevate quantità di questi prodotti di raggiungere il SNC danneggiandolo [48].

### **Teratogenicità:**

L'assunzione di alcol durante la gravidanza espone il feto ai danni che questo può causare: l'alcol può disturbare lo sviluppo fetale, indipendentemente dalla fase della gravidanza in cui viene assunto, compresi gli stadi più precoci, quando la donna può non sapere di essere incinta. Il binge drinking, così come il consumo abituale di grandi quantità di alcol, costituisce il rischio maggiore per la salute del feto, ma la ricerca ha mostrato come anche quantità inferiori di alcol possano essere dannose [43], determinando conseguenze che possono presentarsi in qualsiasi momento dell'infanzia e poi mantenersi tutta la vita.

Gli effetti teratogeni dell'alcol vengono attribuiti all'acetaldeide sfuggita al fegato della madre, alle variazioni del profilo amminoacidico nella circolazione materna e all'ipoglicemia indotta dall'uso di alcol [39]. Questi fattori possono interferire con lo sviluppo di organi vitali e parti corporee, compreso il cervello.

Gli studiosi hanno introdotto il termine Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) per definire tutta una serie di effetti e sintomi provocati dall'esposizione prenatale all'alcol, in cui sono compresi vari disordini, la cui gravità dipende dall'entità del consumo di alcol da parte della madre durante la gravidanza.

Il più grave tra questi disturbi è la Sindrome Alcolica Fetale (FAS), in cui gli effetti a carico del feto comprendono:

- Microcefalia
- Deficienza mentale, con conseguenti problemi nell'apprendimento e nel comportamento
- Scarsa coordinazione muscolare
- Statura inferiore alla media
- Immunità ridotta
- Anormalità strutturali per ossa e alcuni organi
- Caratteristiche anormalità facciali, come sella nasale profonda, occhi piccoli, scanalatura tra labbro superiore e naso indistinguibile, labbro superiore sottile e deposizione di grasso a livello palpebrale.

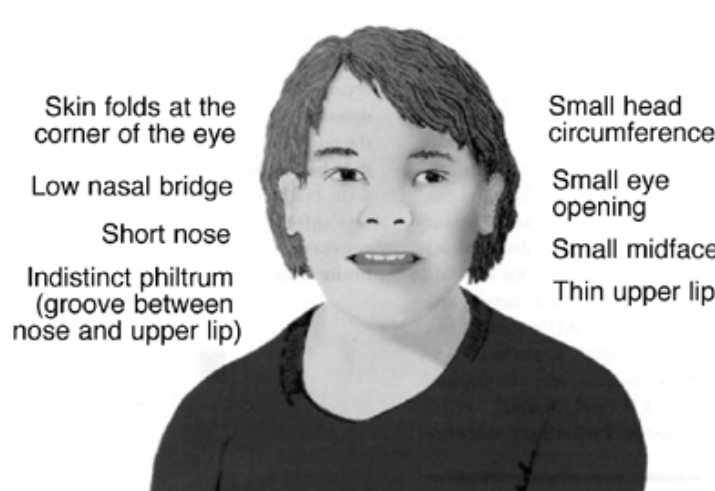


Figura 1. 9 Anormalità facciali in caso di sindrome alcolica fetale.

Altri esempi sono poi la sindrome alcolica fetale parziale (partial FAS), che comprende alcuni sintomi della FAS ma non tutti, i problemi alla nascita relazionati all'alcol (Alcohol-Related Birth Defects, ARBD), tra cui problemi alla vista, all'udito e anomalie fisiche, per esempio a carico di cuore, ossa e reni, ed il disordine del neurosviluppo relazionato all'alcol (Alcohol-Related Neurodevelopmental Disorder, ARND), che include anomalie del SNC, disturbi cognitivi e del comportamento.

In caso di FASD si hanno difficoltà di memoria, attenzione, controllo delle emozioni e dell'impulsività, comunicazione, socializzazione, oltre a problemi nello svolgere attività quotidiane come mangiare, lavarsi, provvedere alla propria sicurezza.

I casi di FASD sono piuttosto difficili da diagnosticare, soprattutto per le similitudini con altri disordini dello sviluppo, come la sindrome da deficit dell'attenzione e disordine ipercinetico.

Ancora oggi la Sindrome Alcolica Fetale è il principale difetto di nascita a poter essere prevenuto.

### **Induzione enzimatica:**

L'Etanolo è un potente induttore enzimatico, in particolar modo nei confronti del complesso del citocromo P-450: di questo si deve tenere conto quando al paziente alcolista vengono somministrati farmaci metabolizzati da questo sistema. Inoltre questa attività aumenta la tossicità epatica di composti, come tetracloruro di carbonio, cloroformio, tricloroetano, tricloroetilene, aflatossina B1. Al contrario,

grazie al meccanismo di competizione per il sistema dell'alcool deidrogenasi può ridurre la tossicità del metanolo e dei glicoli.

### **1.1.4 Farmacoterapia**

Tra gli obbiettivi dei trattamenti farmacologici per la dipendenza dall'alcol si hanno l'ottenimento di una reazione fisiologica avversa all'alcol e il blocco dei processi di rinforzo; allo scopo di normalizzare gli adattamenti all'esposizione cronica all'etanolo e di ridurre il desiderio, sono stati suggeriti farmaci che agiscono sulle vie della gratificazione cerebrali [50]. Altra strategia farmacologica consiste nell'utilizzo di sostanze in grado di ripristinare il bilanciamento tra vie eccitatorie ed inibitorie, in modo tale da ridurre i sintomi dell'astinenza e prevenire il rischio di ricadute.

Per determinare l'efficacia di un trattamento dell'AUD si devono valutare vari fattori tra cui percentuale di giorni in cui il paziente beve, quantità totale di alcol assunto, ricadute, astinenza, desiderio di alcol e attivazione delle vie cerebrali della gratificazione.

#### **Farmaci approvati per il trattamento dell'AUD:**

Ad oggi sono 3 i farmaci approvati dalla US Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dei pazienti adulti dipendenti dall'alcol:

- Disulfiram



- Acamprosato
- Naltrexone

In Europa è stato inoltre approvato l'utilizzo per la dipendenza dall'alcol del Nalmefene.

Il Disulfiram è stato nel 1949 il primo farmaco ad essere approvato per il trattamento dell'alcolismo.

Ha come principale azione farmacologica quella di alterare il metabolismo dell'etanolo, che una volta assorbito viene convertito ad acetaldeide, che viene a sua volta ossidata a livello epatico dall'enzima mitocondriale aldeide deidrogenasi (ALDH); in particolare questo farmaco inibisce l'aldeide deidrogenasi, con conseguente accumulo di

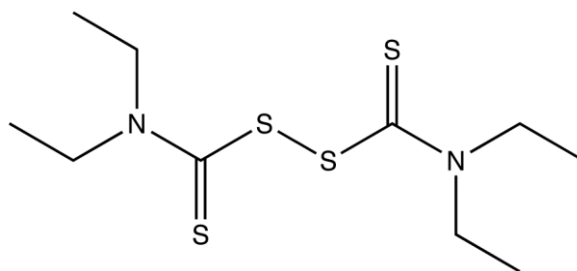


Figura 1. 10 Struttura del disulfiram.

acetaldeide a seguito dell'assunzione di alcol, fino a raggiungere livelli di concentrazione che sono da 5 a 10 volte superiori a quelle normalmente raggiunte dopo aver consumato solo alcol senza assumere disulfiram.

L'accumulo di acetaldeide provoca sintomi fastidiosi, come nausea, vampate di calore, aumento della frequenza cardiaca e abbassamento della pressione sanguigna, che scoraggiano quindi il paziente a continuare l'assunzione di alcol.

Il grado di risposta alla reazione da alcol-disulfiram è direttamente proporzionale alla dose del farmaco e alla concentrazione ematica dell'alcol, anche se anche l'assunzione di piccole quantità di alcol con disulfiram provoca comunque una blanda reazione [51].

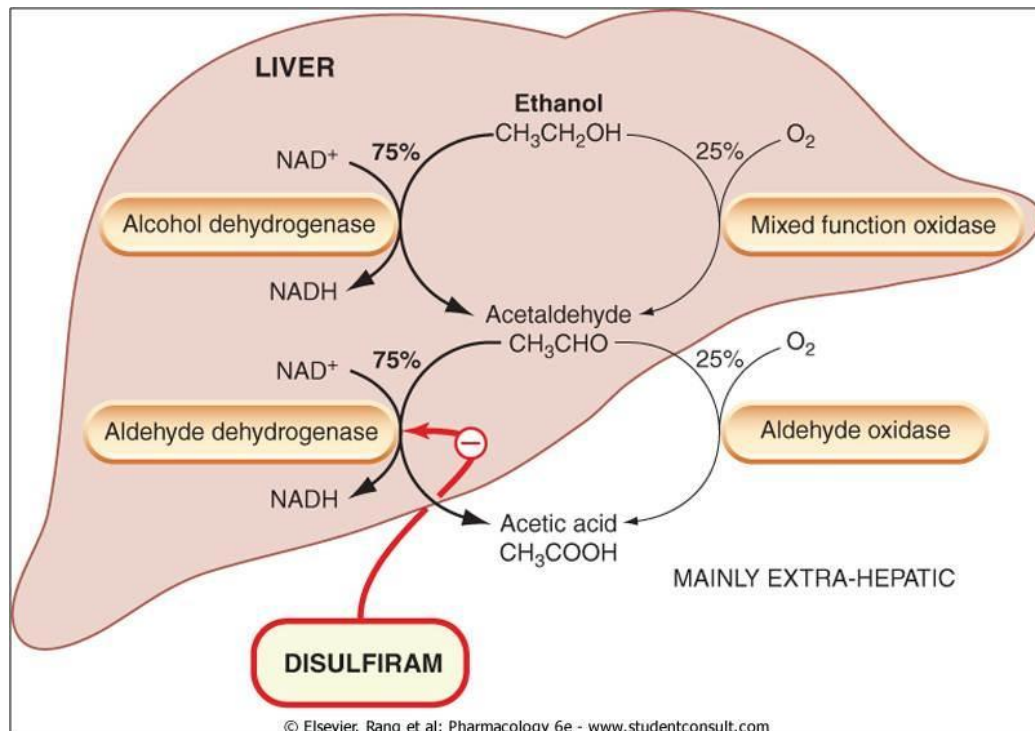


Figura 1. 11 Attività del disulfiram sul metabolismo dell'etanolo.

Dati gli effetti avversi della reazione ad alcol-disulfiram, questo farmaco ha un potenziale beneficio maggiore per i pazienti che sono motivati a smettere di bere e che, all'inizio della terapia, devono fissare l'obiettivo dell'astinenza, con anche il sostegno dei medici [52].

Il principale ostacolo nella terapia con disulfiram è la non compliance da parte del paziente, come dimostra il 20% di compliance nel più grande studio controllato ad oggi, effettuato tra uomini veterani negli USA [53]. Uno studio effettuato su uomini giapponesi che soffrono di

AUD ha dimostrato tassi di miglioramento nell'astinenza solo tra i pazienti con un allele ALDH2 inattivo [54].

L'efficacia del disulfiram potrebbe essere collegata anche a variazioni a livello della trasmissione neuronale, con studi che suggeriscono che la reazione all'acetaldeide non sia necessaria per ottenere dei risultati terapeutici favorevoli [55].

Il Disulfiram deve essere utilizzato con cautela nei pazienti con disturbi epatici, a causa di rari ma fatali casi di epatite, ed è controindicata in caso di patologie cardiache, per l'ipotensione che si presenta nella reazione al farmaco [56].

L'acamprosato è stato approvato dalla FDA per l'uso nei pazienti dipendenti dall'alcol nel 2004.

Ha una struttura simile a quella di amminoacidi endogeni che agiscono come neurotrasmettitori o neuromodulatori in varie regioni cerebrali (glutammato, GABA, glicina).

Non è ancora chiaro il meccanismo d'azione alla base del suo effetto benefico, ma si pensa che agisca ripristinando il bilanciamento tra vie eccitatorie ed inibitorie, alleviando i disturbi fisici e psicologici conseguenti all'astinenza dall'alcol. Probabilmente il suo effetto deriva dalla combinazione di più attività, come l'antagonismo nei confronti dei recettori NMDA glutamatergici, la modulazione dei recettori metabotropici di tipo 5 per il glutammato o la riduzione

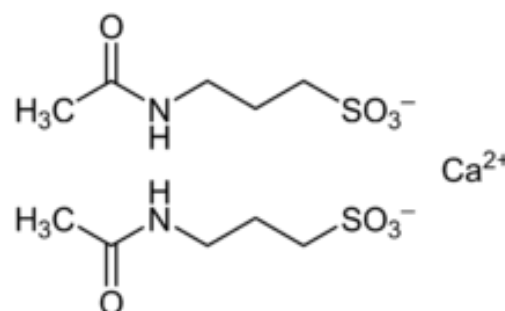


Figura 1. 12 Struttura dell'acamprosato.

dell'accumulo di glutammato a seguito dell'astinenza [57].

Questo farmaco ha un buon profilo di sicurezza e tollerabilità. Dai risultati di studi europei, riguardanti principalmente uomini di mezza età con una storia di dipendenza dall'alcol di 7 o più anni, è emerso che si ottengono miglioramenti significativi per i livelli di astinenza e la percentuale di giorni di astinenza, col trattamento con acamprosato [58, 59].

FDA ha approvato il naltrexone per uso orale nel 1994 ed iniettabile a rilascio prolungato nel 2006, per il trattamento dell'alcolismo, in particolare per ridurre il desiderio di bere [60].

L'attività del Naltrexone consiste nell'antagonismo competitivo nei confronti dei recettori oppioidi e la sua efficacia si pensa sia mediata dalle interazioni tra dopamina e sistema oppioide endogeno. In particolare gli oppioidi endogeni sono coinvolti negli effetti di rinforzo dell'alcol e possono favorire comportamenti di ricerca dell'assunzione di alcol: in modelli animali la somministrazione di alcol promuove la liberazione di  $\beta$ -endorfine nelle regioni cerebrali coinvolte nell'auto-gratificazione; la liberazione dagli effetti inibitori dei neuroni GABAergici da parte delle  $\beta$ -endorfine nell'area tegmentale centrale promuove il segnale dopaminergico da quest'area al Nucleo accumbens.

Il naltrexone è un farmaco relativamente ben tollerato, che ha come effetto collaterale principale

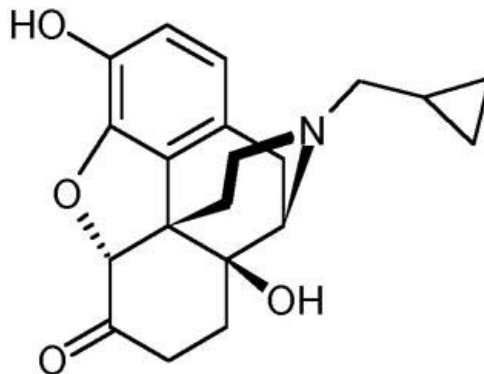


Figura 1. 13 Struttura del naltrexone.

disturbi gastrointestinali; ad alte dosi sembra incrementare il rischio di epatotossicità. Il suo utilizzo è controindicato in pazienti dipendenti da agonisti oppioidi, dato che agisce come antagonista e quindi può scatenare sindrome d'astinenza.

Non è stato riportato un diretto confronto tra la forma orale e quella intramuscolare.

Nalmefene è un modulatore dei recettori oppioidi approvato dal Comitato per i medicinali per uso umano dell'Agenzia Europea per i Medicinali. È stato approvato per il commercio nel febbraio del 2013 per "la riduzione del consumo di alcol nei pazienti adulti con dipendenza da alcol, che hanno un livello di rischio di bere elevato".

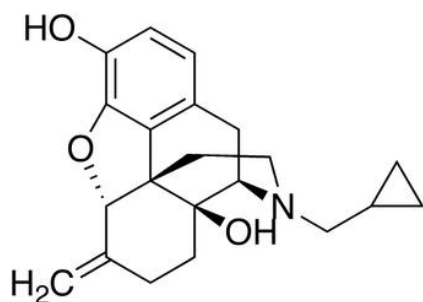


Figura 1. 14 Struttura del nalmefene.

Ha un funzionamento simile a quello del naltrexone, in quanto antagonista dei recettori  $\mu$  e  $\delta$  e agonista dei recettori  $\kappa$  [4]. L'ipotesi è che il blocco dei recettori oppioidi interferisca con gli effetti di rinforzo dell'alcol, riducendo così il desiderio di assunzione.

È stato osservato che nalmefene riduce il numero di drinks nei giorni in cui il paziente alcolista beve, anche se valutando i giorni di astinenza, il numero di giorni in cui il paziente beve in maniera massicci ed il tempo di ricaduta, i dati sono controversi.

Sebbene sembri avere una capacità di ridurre il desiderio dell'alcol superiore rispetto al naltrexone, senza comportare lo stesso rischio di epatotossicità, il suo ruolo nel trattamento della dipendenza dall'alcol rimane non ancora chiaro [4].

### **Farmaci non approvati per il trattamento dell'AUD:**

Sono stati studiati diversi farmaci non approvati per il trattamento dell'AUD, anche per gli effetti negativi dei medicinali già approvati: disulfiram e naltrexone, ad esempio, sono associati ad epatotossicità, quando il 55% delle morti associate all'alcol risultano proprio causate da problemi epatici [61]; l'acamprosato deve essere evitato nei pazienti con gravi danni renali; inoltre questi farmaci non risultano essere efficaci su tutti i pazienti per periodi di tempo indeterminati, portando quindi i medici a cercare altre opzioni per il trattamento di queste patologie [4].

Nell'ambito dei farmaci ad attività antipsicotica, troviamo composti in grado di bloccare vari recettori dopaminergici e, nel caso di quelli di seconda generazione anche quelli 5-HT<sub>2</sub>. Vengono utilizzati per il trattamento della schizofrenia, del disturbo bipolare e come trattamento aggiuntivo nella depressione e nell'autismo. Data l'implicazione della dopamina nelle vie dell'auto-gratificazione associate all'AUD, questi farmaci sono oggetto di ricerca [4].

Tra i farmaci studiati troviamo:

- aripiprazolo, che ad alte dosi (23,3mg al giorno) sembra essere efficace nel ridurre il numero di drinks al giorno, anche se

ancora non è stata stabilita una reale utilità nel trattamento dell'AUD [62, 63].

- olanzapina, che riduce il desiderio di alcol nei giovani adulti (età media 23 anni) [64] ed il numero di drinks al giorno nei soggetti con maggiori abitudini di consumo di base, ma solo in coloro che presentano l'allele lungo del gene per il recettore D4 per la dopamina (DRD4) [65].
- la quetiapina, che a 400mg al giorno per 6 settimane ha dato risultati positivi per ridurre il consumo e l'impulso a bere [66], mentre per 12 settimane ha portato a ridurre il consumo negli alcolisti di tipo B (inizio precoce e patologia più severa) rispetto a quelli di tipo A (inizio tardivo e meno severa) [67]; può non essere efficace in caso di consumo massiccio di alcol, ma può costituire un'opzione per ridurre il consumo nei bevitori minori o negli alcolisti di tipo B [4].

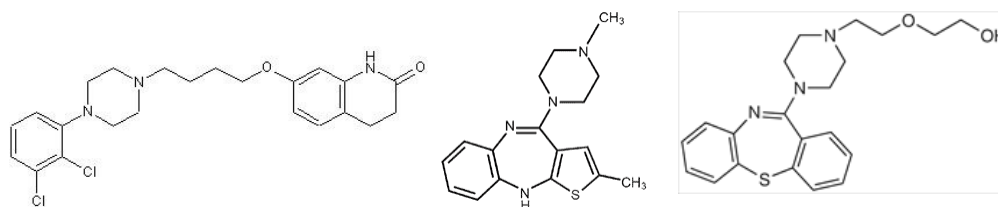


Figura 1. 15 Strutture di (da sinistra) aripiprazolo, olanzapina e quetiapina.

Dal momento in cui gli agonisti dei recettori serotoninergici hanno mostrato una riduzione nel consumo di alcol in studi su animali, possono costituire una futura opzione per il trattamento dell'AUD i farmaci antidepressivi, inibitori selettivi del re-uptake della serotonina (SSRIs), dato che questi agiscono incrementando l'agonismo su tali recettori [4].

In questa categoria troviamo:

- Citalopram, che alla dose di 40mg risulta ridurre il consumo di alcol nei bevitori moderati, soprattutto uomini [68], senza però che questo effetto si ritrovi nei forti bevitori [69].
- Sertralina, che a 200mg al giorno risulta ridurre la tendenza a bere negli uomini alcolisti di tipo A, mentre questi risultati non si presentano per alcolisti di tipo B, donne o uomini [4, 70].

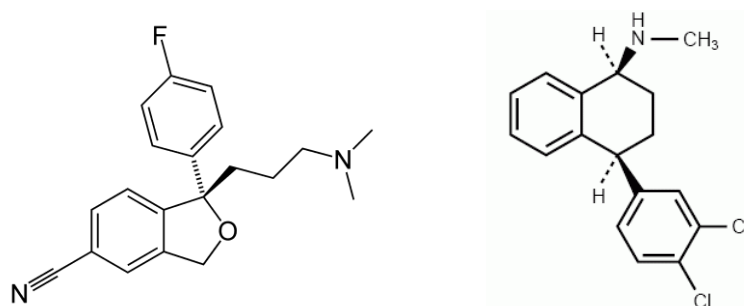


Figura 1. 16 Strutture di (da sinistra) citalopram e sertralina.

Altri esempi si ritrovano nell'ambito dei farmaci anticonvulsivanti, che sono utilizzati per il trattamento di disturbi convulsivi e, in alcuni casi, per il trattamento del dolore cronico e per la stabilizzazione dell'umore. Possono avere vari meccanismi d'azione, tra cui il blocco dei canali per il sodio, l'aumento del GABA, l'antagonismo dei recettori glutammatergici ed il blocco dei canali del calcio [4].

Tra i farmaci studiati si ritrovano:

- Gabapentin, che alla dose di 1,200mg al giorno ha incrementato i giorni di astinenza nei pazienti con una più severa sindrome d'astinenza e ha ridotto la ricaduta in pazienti che soffrono di insonnia [71]. Alla dose di 600mg ha apportato benefici in forti



bevitori [72], mentre in aggiunta al naltrexone ha ridotto il consumo e l'impulso a bere [73].

- Topiramato, che alla dose di 300mg al giorno ha superato il placebo in numerose misure del consumo, nell'ambito di vari studi; è risultato equivalente al naltrexone in uno studio in cieco, per quanto riguarda astinenza e ricadute [4, 74].
- Oxcarbazepina, che si è rivelata in alcuni studi equivalente in efficacia all'acamprosato ed al naltrexone, mettendo a confronto il tempo della prima ricaduta; a dosi più elevate (1,500-1,800mg al giorno) si è rivelata superiore al naltrexone in un numero di pazienti che è rimasto senza alcol [75, 76].
- Sodio valproato (VPA) ha ridotto significativamente la ricaduta al consumo elevato in uno studio in cieco, a confronto col placebo, riducendo anche la quantità consumata e il desiderio di alcol [77].
- Tra gli altri anticonvulsivanti, la carbamazepina e la zonisamide hanno un potenziale uso nel trattamento della dipendenza da alcol, come sostengono alcuni studi placebo-controllati [4].

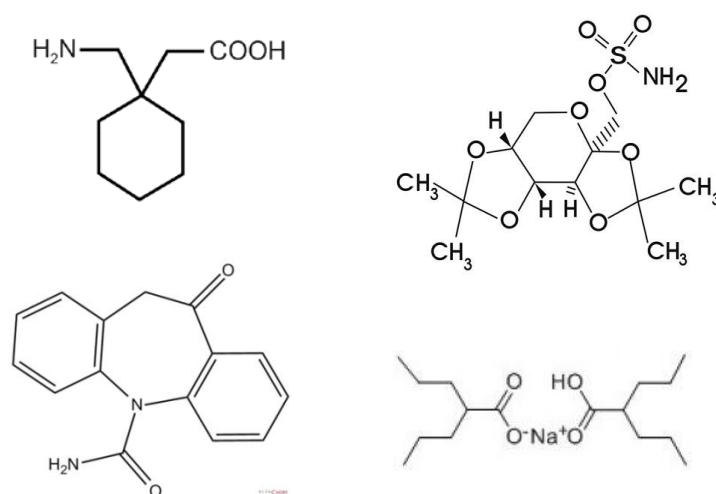


Figura 1. 17 Strutture di (da sinistra in alto, in senso orario) gabapentin, topiramato, oxcarbazepina e sodio valproato.

Altri farmaci che possono costituire un potenziale trattamento per l'alcolismo sono:

- Baclofene, che è un miorilassante centrale, approvato per l'utilizzo nella spasticità muscolare; si tratta di un agonista dei recettori GABA-B, che quindi attraverso questo meccanismo può inibire la risposta dopaminergica all'alcol [4]. Alla dose di 30mg al giorno questo farmaco ha mostrato effetti positivi rispetto al placebo per quanto riguarda l'astinenza, il desiderio di bere e l'assunzione giornaliera di alcol [78]. A dosi maggiori (60mg al giorno) ha prodotto una risposta più robusta nella riduzione del numero di drinks giornalieri [79].
- Ondansetron, che è un farmaco ad attività antiemetica, che agisce bloccando i recettori 5-HT<sub>3</sub>; data l'attività dell'alcol su tali recettori, si pensa che possa essere utile nel trattamento della dipendenza [4]. Da degli studi è emerso che Ondansetron riduce significativamente il consumo giornaliero nei bevitori leggeri, mentre non è stato osservato alcun beneficio nei consumatori di più di 10 drinks al giorno [80]. Altri studi, in cui si sono utilizzate dosi basate sul peso, hanno trovato benefici sull'astinenza, il desiderio di bere e i drinks totali [4].
- L'estratto di Kudzu (*Pueraria lobata*): la radice di Kudzu è stata storicamente studiata per il trattamento nell'alcolismo; il meccanismo non è totalmente compreso, ma si pensa che l'estratto della radice di Kudzu possa alterare l'attività degli enzimi aldeide deidrogenasi e monoamminossidasi, portando a

ridurre il consumo di alcol. È stato studiato su bevitori uomini non in cerca di trattamento per un periodo di 4 settimane e, se confrontato al placebo, ha portato alla riduzione del consumo settimanale di alcol e all'aumento dei giorni di astinenza costante. Inoltre la puerarina (uno dei principali isoflavoni della radice di kudzu) in confronto al placebo ha dimostrato ridurre la quantità di birra consumata in grandi bevitori non diagnosticati. In entrambi gli studi non si ha però una riduzione del desiderio soggettivo di alcol, aspetto che può limitarne l'uso clinico [83, 84].



Figura 1. 18 *Pueraria lobata*, fam. Fabaceae

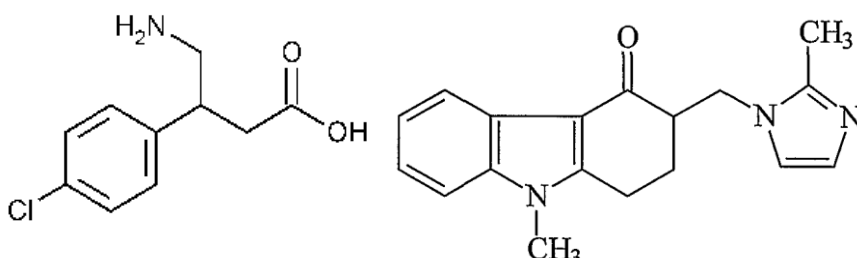


Figura 1. 19 Strutture di (da sinistra) baclofene e ondansetron.

## 1.2 Proteomica

Il termine proteomica fu coniato nel 1995 e definisce la caratterizzazione su larga scala di tutte le proteine di una linea cellulare, un tessuto o un organismo [85, 86, 87]; il proteoma infatti corrisponde all'insieme di tutte le proteine espresse da un genoma. Lo scopo della proteomica è quello di ottenere una visione globale ed integrata di tutte le proteine che costituiscono la cellula, oltre al loro studio individuale [88].

Sono le proteine, e non i geni, gli effettori delle funzioni cellulari, per cui solo con lo studio del genoma sarebbe impossibile avere informazioni sui vari meccanismi patologici, identificare i target dei farmaci e studiare le modifiche post-traduzionali delle proteine [89, 90]; l'importanza dello studio del proteoma, rispetto a quello relativo al genoma, è rappresentato soprattutto proprio dalla possibilità di studiare le modifiche post-traduzionali che si riflettono sulla funzionalità della proteina [91, 92].

Il proteoma è infatti un'entità dinamica poiché cellule di uno stesso organo esprimono proteine differenti ed anche lo stesso tipo di cellule in condizioni diverse (età, malattia, ambiente) può esprimere proteine diverse [93].

Sulla base di considerazioni metodologiche, si distinguono tre aree principali in questo ambito di studio:

- La proteomica funzionale, che permette la caratterizzazione dell'attività, delle interazioni e delle modifiche post-traduzionali delle proteine, allo scopo di descrivere i meccanismi cellulari a livello molecolare.
- La proteomica strutturale, che studia l'arrangiamento fisico degli amminoacidi in una proteina e che sfrutta tecnologie come la cristallografia a raggi X e la spettroscopia NMR.
- La proteomica d'espressione, che si concentra su modelli d'espressione proteica e sulle modifiche in caso di salute o patologia. Questo ramo è esploso con l'avvento delle nuove tecnologie ad alta velocità per la separazione proteica, la quantificazione e l'identificazione [94].

Generalmente uno studio proteomico è composto dalle seguenti fasi:

- I fase: scelta e preparazione del campione.
- II fase: separazione delle proteine; una delle tecniche più utilizzate è l'elettroforesi bidimensionale anche se ha dei limiti.
- III fase: identificazione delle proteine tramite l'uso della spettrometria di massa; le proteine identificate vengono poi confrontate con quelle già presenti nel database, che contiene le proteine codificate dal genoma.

La principale tecnologia utilizzata per l'identificazione proteica è la spettrometria di massa (MS), accoppiata a metodi di separazione delle proteine [95].

La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine: è utilizzata per quantificare le proteine e per determinarne sequenza, massa e informazioni strutturali (in particolare modifiche post-traduzionali, come glicosilazioni o fosforilazioni) [96].

Il successo nell'identificazione della proteina dipende dalla preparazione del campione e dal tipo di spettrometro di massa utilizzato. La combinazione della MS, per l'identificazione proteica, con l'elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e il più utilizzato in questo tipo di studi [97].

La 2-DE consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici. Questa tecnica, introdotta nel 1975 da O'Farrel e Klose, prevede di applicare inizialmente gli estratti proteici ad un gel a gradiente di pH, esponendoli ad una corrente elettrica che induca le proteine a migrare ad una distanza e in una direzione che dipendono dalle loro cariche elettriche complessive. Questa prima fase è quella di isoelettrofocalizzazione (IEF), in cui la separazione proteica avviene quindi in base al punto isoelettrico (pI). Successivamente, con la seconda fase, si effettua un'elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE), che separa le proteine secondo il peso molecolare (PM), determinando la loro migrazione in una direzione perpendicolare alla prima.

Con questa tecnica è quindi potenzialmente possibile separare in spot individuali con specifiche coordinate, migliaia di proteine diverse presenti in un campione, distinguendo anche tra proteine che differiscono tra loro solo per modifiche post-traduzionali. Gli spot proteici possono poi essere visualizzati mediante la colorazione con specifici coloranti.

Lo sviluppo di nuove tecniche di spettrometria di massa e la disponibilità di sequenze genomiche ha determinato negli ultimi anni un crescente interesse da parte del mondo scientifico verso la proteomica, che costituisce ad oggi un moderno mezzo nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e, soprattutto, per identificare markers di una patologia. Questi composti costituiscono degli indicatori della presenza della malattia nell'organismo e possono consentire, pertanto, una diagnosi tempestiva che permette di massimizzare le possibilità di successo di eventuali trattamenti terapeutici [94].

Data l'utilità diagnostica dei biomarkers, è fondamentale che questi siano in grado di classificare correttamente i vari pazienti. L'utilità di un biomarker è valutata mediante due parametri: sensibilità e specificità. La sensibilità valuta la frazione di positivi effettivi che sono correttamente identificati, mentre la specificità la frazione di negativi correttamente identificati. Il biomarker ideale avrebbe 100% di sensibilità e di specificità, ma questa è una situazione impossibile

da raggiungere a causa delle varie differenze individuali a livello genetico, ambientale, per concomitanza di altre patologie, ecc... [94]

### **1.2.1 L'analisi proteomica nell'alcolismo**

L'abuso di alcol e la dipendenza da questo sono disordini molto comuni che possono portare ad una moltitudine di problemi sociali e di salute. L'eccessivo consumo di alcol ha gravi conseguenze sull'organismo: non solo determina danni epatici, ma risulta avere un legame causale anche con lo sviluppo di neoplasie e con l'aggravamento di patologie, quali diabete e disturbi cardiovascolari [94]. A livello sociale, l'alcol è correlato ad una maggiore frequenza di problemi familiari, aggressioni, incidenti d'auto e problemi finanziari [98]. È stato calcolato che in totale l'abuso di alcol ha un costo di 185 miliardi di dollari l'anno solo negli USA [99], mentre nei paesi europei è responsabile del 9% della spesa sanitaria [100]. È stato stimato che il 3,8% delle morti globali e il 4,6% delle disabilità sono attribuibili all'alcol [101].

Ha quindi un'importanza fondamentale la valutazione accurata del comportamento nei confronti dell'alcol, allo scopo di diagnosticare ed applicare una terapia adeguata per l'AUD. Ad oggi tuttavia il principale metodo per stabilire i vari modelli di consumo di alcol è ancora costituito dai sondaggi, tesi a quantificare l'assunzione di alcol mediante auto-resoconto, ma con scarsa utilità diagnostica, specialmente in situazioni di disturbo mentale o in quei casi in cui i



pazienti tendono a negare o minimizzare la reale entità del consumo alcolico, per evitare conseguenze personali, legali e professionali [94]. Per quanto riguarda il consumo alcolico acuto, questo può essere facilmente identificato mediante la misurazione dei livelli di etanolo nel sangue e nel respiro, ma tali metodi non consentono invece di valutare i vari modelli di consumo di alcol che sono notevolmente più utili per diagnosticare l'alcolismo.

Nell'ambito dei biomarkers per individuare l'abuso di alcol, sono attualmente utilizzati a livello clinico sia markers di natura non proteica che markers proteici, anche se tuttora non accurati e non ancora ampiamente accettati come test oggettivi per valutare inequivocabilmente il consumo di alcol nell'arco di giorni o settimane [102]. Alla luce di queste lacune è notevole la necessità di sviluppare markers adeguati per l'abuso di alcol.

Gli Istituti Nazionali di Sanità (NIH, National Institutes of Health) definiscono "biomarker" come "una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come indicatore di normali processi biologici, patogeni o di risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico" [103]; questo stabilisce quindi che, nell'ambito del'abuso di alcol, il biomarker costituirebbe un accurato indicatore del consumo individuale di alcol in un determinato periodo di tempo [94].

I biomarkers per l'alcolismo hanno importanti applicazioni in ambito medico e della pubblica sicurezza:

- In ambito clinico costituiscono un parametro oggettivo del consumo di alcol in modo da facilitare la diagnosi dell'AUD;
- Possono essere utilizzati per verificare il progresso di patologie correlate all'alcol;
- Permettono di valutare l'efficacia della terapia per l'abuso di alcol;
- Possono andare a verificare o anche sostituire gli auto-resoconti dei pazienti nella diagnosi;
- Nell'ambito della pubblica sicurezza, potrebbero essere valutati per monitorare l'astinenza in soggetti ad alto rischio, come donne in stato di gravidanza (per la prevenzione della sindrome alcolica fetale), o individui precedentemente condannati per un crimine, oppure ancora soggetti impegnati in occupazioni che influiscono sul benessere della popolazione, come la cura dei pazienti o il trasporto aereo.

Le tecniche di proteomica sono strumenti fondamentali per la scoperta, la caratterizzazione e la validazione di nuovi biomarkers proteici per l'abuso di alcol.

Recenti studi hanno valutato la necessità di utilizzare gruppi di biomarkers, piuttosto che singoli biomarkers, per valutare accuratamente il comportamento individuale nei confronti dell'alcol. Col crescente uso delle tecniche proteomiche nell'ambito dell'alcolismo, è probabile un incremento dello studio di gruppi di biomarkers [94].

## 1.3 La saliva

I fluidi biologici, come sangue, urina, saliva, sudore e lacrime contengono una grande quantità di proteine e costituiscono un'importante finestra sui processi biologici e funzionali dell'organismo. Alcuni di questi, come sangue, urine e fluido cerebrospinale hanno trovato importanti applicazioni cliniche, per il monitoraggio della salute e per la diagnosi di patologie [104]. Le matrici biologiche utilizzate dipendono dallo scopo dell'analisi, dalla legislazione e dalla disponibilità; la scelta della matrice influenza la significatività del dato analitico dal momento che ciascuna riflette una finestra temporale caratteristica [105]. Le più comuni procedure diagnostiche di laboratorio prevedono l'analisi dei costituenti cellulari e chimici del sangue, ma altri fluidi biologici possono essere utilizzati e tra questi anche la saliva, che offre diversi vantaggi [106].

La saliva è il fluido biologico che bagna la cavità orale; essa contiene numerosi componenti salivari (secrezioni delle ghiandole salivari: ghiandole paratiroidi, sottomandibolari, sublinguali e salivari minori) e non salivari (come il fluido crevicolare gengivale, secrezioni nasali e bronchiali, sangue derivante da ferite, microrganismi e residui di cibo presenti nella cavità orale). È composta principalmente da acqua (circa il 99%), oltre che da peptidi, proteine (tra cui enzimi), lipidi, zuccheri, elettroliti. La saliva svolge ruoli fondamentali nella cavità orale, tra cui lubrificazione, idratazione, protezione da microrganismi, protezione dei denti dalla demineralizzazione, favorendo la mineralizzazione, digestione (contiene enzimi digestivi, in particolare

l'amilasi salivare), mantenimento dell'omeostasi della cavità orale, mediante tamponi fosfato e carbonato, ed aiuta nella masticazione e nella parola [104].

Esistono vari vantaggi offerti dalla saliva se utilizzata come matrice biologica per procedure diagnostiche:

- ✓ può essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature;
- ✓ la raccolta del materiale comporta meno problemi se comparata col prelievo di sangue in pazienti non collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali);
- ✓ può fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni.

Quest'ultimo aspetto non è di minore importanza: il rapporto beneficio–costo deve essere considerato necessariamente nell'ottica di una routine a livello di diagnosi e di monitoraggio di un trattamento, quando occorre fare i conti con un bilancio ed una programmazione di spesa. Le scelte diagnostiche comunque non possono essere effettuate con l'unico criterio del costo, ma con opportune considerazioni tecniche come la validità del test, i vantaggi di utilizzo e l'affidabilità. La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole stesse, ma è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata per la diagnosi di malattie sistemiche, poiché contiene alcuni costituenti del siero che possono raggiungere le ghiandole salivari attraverso una via intracellulare (diffusione passiva)

o attraverso una via extracellulare (ultrafiltrazione attraverso le giunzioni strette tra le cellule) [106].

I componenti del siero possono poi raggiungere la saliva anche attraverso il flusso del fluido gengivale.

Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva per scopi diagnostici, soprattutto nel caso di malattie sistemiche (ereditarie, autoimmuni, infettive) e malattie virali, ma anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni.

Un buon approccio nello studio della saliva è l'identificazione delle sue componenti proteiche tramite analisi proteomica. In particolare, un confronto tra pazienti sani e malati può rilevare unici o incrementati livelli di proteine specifiche che possono essere usati come biomarkers. Si può, con tale approccio, fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni [106].

## Capitolo 2

### Scopo della tesi

In uno studio precedente condotto nel laboratorio, in collaborazione col Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica (Sezione di Medicina Forense) e col Dipartimento Delle Dipendenze Di Pisa (SerT Valdera), è stata utilizzata l'elettroforesi bidimensionale accoppiata alla spettrometria di massa per caratterizzare e confrontare la mappa delle proteine contenute nei campioni salivari di pazienti affetti da alcolismo e di soggetti astemi, che hanno costituito il gruppo di controllo sano. Tra le due classi analizzate sono state riscontrate interessanti differenze nell'espressione di 12 proteine.

Lo scopo della tesi è quello di verificare e confermare, tramite SDS-PAGE e Western Blot, l'effettiva diversità d'espressione di alcune di queste proteine, selezionate sulla base dei dati ottenuti dalla spettrometria di massa .

Le proteine in questione sono:

- Immunoglobulin J chain
- 78 kDa glucose-regulated protein
- Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E
- Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

L'obiettivo alla base di questo lavoro, pertanto, è l'individuazione attraverso tecniche di proteomica di potenziali biomarcatori che

possano favorire la diagnosi dell'alcolismo, il cui strumento principale è ancora oggi costituito da questionari di auto-resoconto, che presentano numerosi limiti. Infatti, mentre il consumo acuto di alcol può essere facilmente verificato mediante la misurazione dei livelli di etanolo nel sangue o nel respiro, è ancora oggi difficile ottenere indicazioni precise relativamente al consumo di alcol a lungo termine. L'utilizzo di biomarkers per l'alcolismo trova numerose applicazioni ed utilità sia in ambito medico che per la pubblica sicurezza.

## Capitolo 3

### Materiali e metodi.

#### 3.1 Materiali e strumentazione

Gli apparecchi utilizzati per la corsa elettroforetica (Protean II XL Ready Gel) e per il Western Blot (Trans-Blot Turbo, transfer system) sono prodotti della Bio-Rad (Hercules, CA, U.S.).

L'acquisizione in chemiluminescenza è stata effettuata utilizzando lo strumento ImageQuant LAS4010 (GE-Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

L'acqua di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England). Glicerolo, Sodio DodecilSolfato (SDS), Tris Base, Tetrametilendiammina (TEMED), Ammonio Persolfato, Glicina e N,N-metilenbisacrilammide sono stati acquistati presso AppliChem (Darmstadt, Germany). Il luminolo (ECL) è un prodotto della PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, U.S.).

Gli anticorpi Anti-lipocalin 2 antibody, Anti-transglutaminase 3 antibody e Rabbit polyclonale to GRP78BIP sono stati acquistati da Abcam (Cambridge, MA USA); IgJ antibody è un prodotto Thermo Fisher SCIENTIFIC (Waltham, MA USA), mentre ANTI-BIOTIN è stata acquistata da Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts).



Tutti gli altri reagenti e solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

### **3.2 Reclutamento dei pazienti**

Per questo studio sono stati reclutati 22 pazienti alcolisti, che sono stati inizialmente sottoposti ad un questionario avente come scopo quello di raccogliere informazioni relative ad aspetti demografici, storia della patologia ed abuso di altre sostanze.

I campioni salivari sia di questi pazienti che dei 15 soggetti astemi sono stati raccolti al mattino in condizioni standard.

Nella tabella seguente sono stati riportati i dati raccolti sui pazienti alcolisti. Si precisa che i soggetti affetti da patologie croniche o infezioni virali sono stati esclusi dallo studio.

n. Cp	$\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right]$	età	sesso	anni abuso	ultima assunzione	sost. stupef	fumatore	sigarette die	terapia di disassuefazione	da quanto	malattie croniche
1	5,86	35	F	3	3gg	no	si	15	si	1 settimana	no
2	3	33	M	15	3gg	no	si	20 (ha fumato nell'ora prec.)	si (Disulfiram 400mg/die, GHB 30ml/die)	2gg	no
3	2,67	40	M	10	3gg	no	no		si (clordiazepossido, disulfiram, paroxetina)	2gg	no
4	3,2	47	M	5	1gg	no	si	30	no	?	epatopatia cronica esotossica, piastrinopenia
5	6	46	M	3	1gg	no	si	25	no		no
6	2,4	31	M	3	3 ore	si	si	20	no		HCV +
7	4,7	37	F	<1	1gg	no	no		no		no
8	1,17	N.p.	M	5	1gg	si	si	30	no		no
9	3	60	M	9	1gg	no	no		no		Diabete tipo II
10	4,3	56	M	10	3 ore	in passato	si	30	si	appena iniziata	HCV +
11	1,9	19	M	1	1gg	no	si	20	no		no
12	3,4	46	M	15	1gg	no	si	5	no		no
13	1,9	52	M	34	1gg	no	si	10-15	no		no
14	2,5	37	M	<1	1gg	no	si	10.15	no		no
15	3,3	33	M	2	1gg	no	si	30gr tabacco	no		si ma non specificata
16	2,7	33	M	15	1gg	no	si	50g tabacco/ sett	si (GHB)	marzo-giugno 2013	sinusite

n. Cp	$\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right]$	età	s e s s o	anni abuso	ultima assunzione	sost. stupef	fumatore	sigarette die	terapia di disassuefazione	da quanto	malattie croniche
17	4,9	37	M	5	1gg	no	si	30	Si (Clordiazepossido)	10gg	epatite HCV correlata
18	4,7	44	M	4	1gg	no	sì	40 o 25g tabacco	no		
19	1,9	28	M	2	1gg	no	si	20	no		Asma allergica
20	2	19	F	5	2gg	no	si	5	no		no
21	5,8	48	F	20	1gg	no	si	20	no		
22	2,9	40	M	8	2gg	no	si	20	si	1gg	Glomerulonefrite cronica

### **3.3 Raccolta e preparazione dei campioni**

I campioni di saliva dei pazienti alcolisti sono stati raccolti presso il Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica (Sezione di Medicina Forense) in collaborazione col Dipartimento Delle Dipendenze Di Pisa (SerT Valdera).

La raccolta è avvenuta senza stimolazione chimica, secondo il protocollo, al mattino presto (tra le 8 e le 11) ed in condizioni standard: è stato quindi chiesto ai pazienti di evitare di mangiare e bere nelle 2 ore precedenti, evitando anche il consumo di gomme da masticare e caramelle. In particolare, la raccolta dei campioni è stata effettuata mediante l'utilizzo di un tampone: è stato chiesto a ciascun paziente di masticare delicatamente per 2 minuti una piccola spugna destinata alla raccolta della saliva (Surescreen Diagnostics LTD), come riportato in figura 3.1.

Per minimizzare la degradazione delle proteine, i campioni vengono immediatamente posti in ghiaccio.

Da ciascun soggetto sono stati prelevati tra 1 e 2,5mL di saliva.

Per rimuovere i detriti e le cellule è stata effettuata immediatamente una centrifugazione a 17.000g per 20 minuti a 4°C, così da rendere chiari i campioni, che sono stati quindi posti a -80°C.

La quantità di proteine risultante dal sovrnatante è stata determinata mediante il dosaggio proteico DC/BIORAD, utilizzando l'albumina di siero bovino (BSA) come standard.

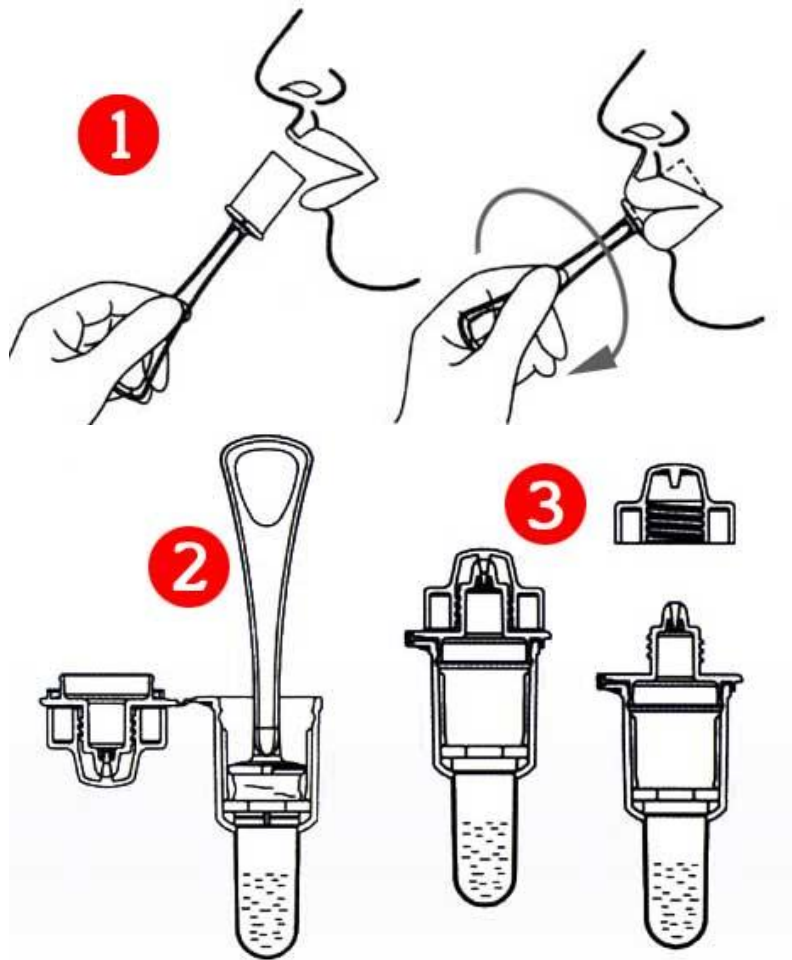


Figura 3.1 Raccolta di campioni salivari mediante l'utilizzo del tampone.

### 3.4 Dosaggio proteico

Il dosaggio proteico DC è un saggio colorimetrico per la quantificazione delle proteine basato come principio sul saggio di Lowry, che a sua volta si basa sulla colorazione blu con un massimo di assorbimento intorno a 750nm, ottenuta per una combinazione della reazione del Biureto con la riduzione del reattivo fosfomolibdico-fosfotungstico per i fenoli, il reattivo di Folin-Ciocalteu.

Sono state preparate cinque concentrazioni (con un volume di 20 µl) di proteina standard (0,3-0,6-1,2-1,8-2 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (come riportato in tabella).

	H <sub>2</sub> O milliQ	BSA	Concentrazione	µg BSA
Bianco	20 µl	-	0 µg/µl	0 µg
1	17 µl	3 µl	0,3 µg/µl	6 µg
2	14 µl	6 µl	0,6 µg/µl	12 µg
3	8 µl	12 µl	1,2 µg/µl	24 µg
4	2 µl	18 µl	1,8 µg/µl	36 µg
5	-	20 µl	2 µg/µl	40 µg

Per il dosaggio proteico del campione incognito si è proceduto con una diluizione 1:4 della saliva, in modo da avere un volume finale di 20µL.

Il dosaggio è stato effettuato in doppio, a temperatura ambiente.

Agli standards ed ai campioni così preparati sono stati aggiunti 100µl di reagente A\*; sono stati quindi agitati su vortex e incubati per 1 minuto. Quindi sono stati addizionati 800µl di reagente B, per poi agitare nuovamente su vortex. Dopo 30 minuti di incubazione si è proceduto alla lettura dell'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm mediante spettrofotometro.

Coi valori ottenuti, a cui corrispondono concentrazioni note di proteina standard, è stata costruita una retta di taratura ( $y=mx$ ), tramite la quale si è

potuto procedere al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito, secondo la formula:

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

### 3.5 SDS/PAGE e Western Blot

Si tratta di una tecnica ampiamente utilizzata per individuare ed analizzare le proteine in un campione, basandosi sulla proprietà che queste hanno di legare specifici anticorpi.

La tecnica fu descritta per la prima volta da Towbin e collaboratori nel 1979, per divenire una delle più utilizzate nella ricerca scientifica per l'analisi qualitativa di miscele di proteine in base alle loro dimensioni.

Prevede inizialmente la separazione delle proteine contenute nel campione tramite elettroforesi, ovvero tramite la migrazione delle macromolecole dotate di carica sotto l'impulso di un campo elettrico; in particolare in caso di SDS-PAGE si utilizza un gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS), detergente anionico che rompe i legami non covalenti delle proteine, con conseguente effetto denaturante, per poi conferire loro una carica netta negativa. Il principio di questa metodica consiste infatti nel conferire alle proteine una carica negativa di densità omogenea e sfruttare quindi la mobilità elettroforetica che in queste condizioni dipenderà esclusivamente dalle forze frizionali e quindi dalle dimensioni delle proteine.

Come mostrato in figura la proteina viene dapprima denaturata, assumendo una forma allungata, per essere poi circondata dalle molecole di SDS che conferiscono la carica netta negativa.

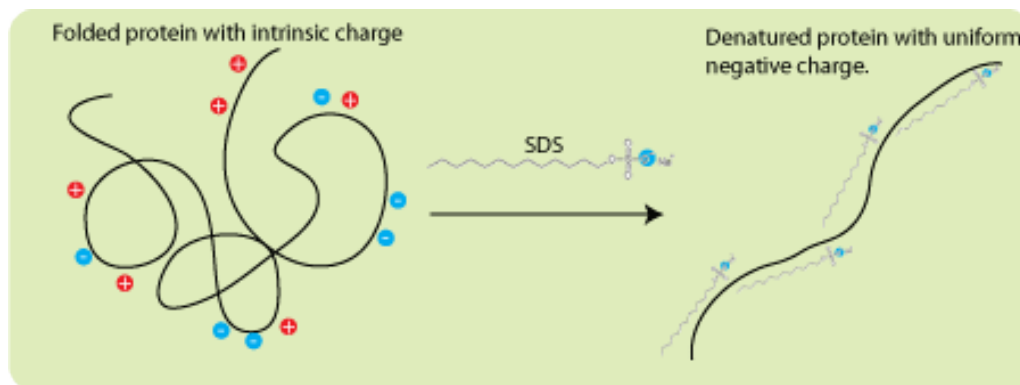


Figura 3.2 Effetto di SDS sulle proteine.

Successivamente si procederà col trasferimento del materiale proteico su una membrana di nitrocellulosa o PVDF; infine le proteine vengono individuate grazie a specifici anticorpi. Ciascun anticorpo si lega infatti ad una specifica sequenza amminoacidica, detta epitopo, e poichè le proteine differiscono per sequenze amminoacidiche, gli anticorpi possono riconoscere specifiche proteine tra molte altre.

Per prima cosa i campioni vengono preparati per il caricamento: un volume di campione che contenga 25 µg di proteine viene quindi solubilizzato in Laemmli buffer, che si può utilizzare in diverse concentrazioni (1X, 2X, 3X e 5X) ed è costituito da:

- Tris-HCl
- Glicerolo, che permette al campione di avere la densità necessaria per depositarsi sul fondo del pozzetto;
- SDS



- $\beta$ -mercaptoetanolo, che riduce i ponti disolfuro presenti tra le proteine.
- Blu di bromofenolo, un colorante ad alta mobilità elettroforetica che permette di visualizzare la corsa.

L'aggiunta di Laemmli buffer viene effettuata in modo tale da arrivare ad un volume pari a 20  $\mu$ L, che corrisponde a quello da caricare nel pozzetto, con una concentrazione 1X.

I campioni sono stati quindi agitati su vortex e fatti bollire per 5 minuti a 100°C prima del caricamento, per assicurarne la denaturazione.

Assieme ai campioni è stato fatto correre anche lo standard: vengono in particolare preparati 5 $\mu$ L di soluzione, costituita da 1 $\mu$ L di standard e 4 $\mu$ L di Laemmli buffer 1X.

Si deve quindi preparare il running gel al 12% di acrilammide, costituito da:

- Acqua MilliQ
- Tris buffer pH 8.8
- Acrilammide 30%
- Ammonio persolfato (APS) 10%
- SDS
- Temed

Il running gel così ottenuto viene colato tra i due vetri (vetro di supporto e spaziatore), per poi essere coperto con butanolo; una volta che il gel è polimerizzato tra i due vetri, si lava con acqua per eliminare il butanolo e si percola lo stacking gel, inserendo l'apposito pettinino per la preparazione dei pozzetti, lasciandolo poi polimerizzare al di sopra del running gel.

Lo stacking gel differisce dal running per la sua maggiore porosità (che consente l'impaccamento di tutte le proteine in una banda sottile prima del

loro passaggio nel running gel), oltre che per pH e forza ionica, ed è così costituito:

- Acqua MilliQ
- Tris buffer pH 6.8
- Acrilammide 30%
- APS
- Temed

In ogni pozzetto vengono quindi caricati 20 $\mu$ L per i campioni o 5 $\mu$ L per lo standard, che in particolare solitamente viene caricato nel primo pozzetto. Una volta terminato il caricamento si aggiunge il tampone di corsa nella camera elettroforetica.

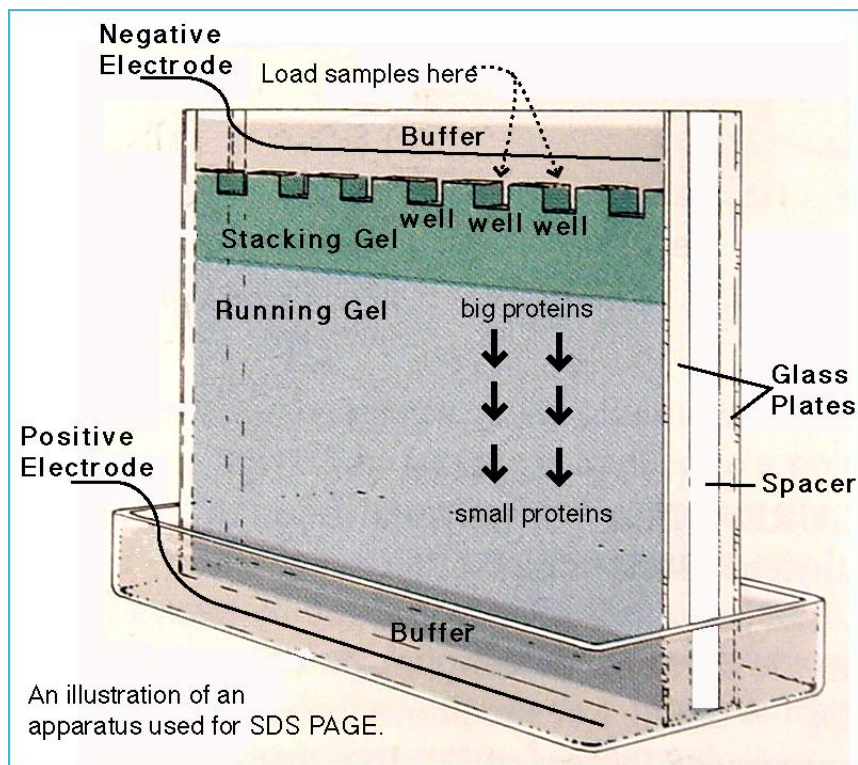


Figura 3.3 Schema di preparazione dell'SDS-page.

La corsa viene effettuata in due fasi: i primi 15 minuti a 8 mA, per poi aumentare l'ampereaggio a 20 mA fino al termine della corsa, evidenziata dalla fuoriuscita del colorante.



Figura 3. 4 Strumentazione per la corsa elettroforetica.

Terminata la corsa elettroforetica si effettua il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa, grazie al passaggio di corrente che fa sì che le frazioni proteiche si leghino irreversibilmente alla membrana di nitrocellulosa mediante interazioni idrofobiche.

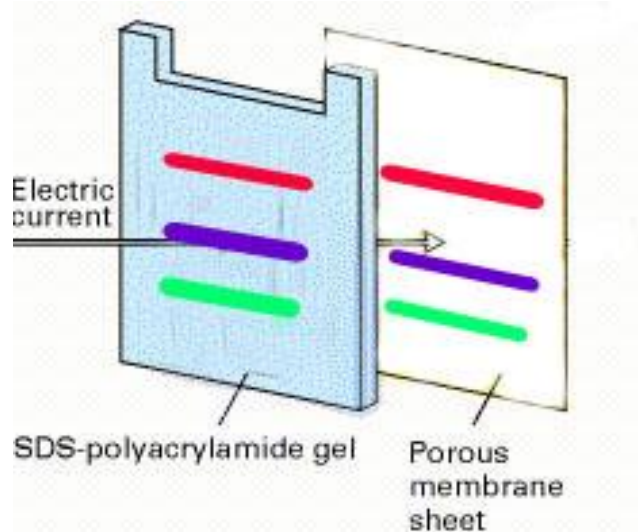


Figura 3.5 Rappresentazione schematica del trasferimento delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa.

La membrana di nitrocellulosa con le proteine viene quindi posta per un'ora in agitazione a temperatura ambiente con 13mL di soluzione PBS-milk per il blocking. Tale soluzione è così composta :

- Low fat dried milk 3%
- Tween 20 0.2%
- PBS (3% 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.4, 0.9% NaCl)

La soluzione di blocking ha la funzione di prevenire le interazioni idrofobiche non specifiche tra l'anticorpo e la membrana.

Successivamente al blocking la membrana di nitrocellulosa viene incubata overnight a 4°C in 5mL di PBS-milk in cui è stato sciolto l'anticorpo primario. Gli anticorpi primari utilizzati, per ognuno dei quali è stato ripetuto il procedimento descritto finora, sono stati:

- ✓ Anti-lipocalin 2 antibody, alla concentrazione di 2µg/mL
- ✓ Anti-transglutaminase 3 antibody, alla concentrazione di 1µg/mL
- ✓ IgJ antibody, diluito 1:1000
- ✓ Rabbit polyclonal to GRP78BIP, diluito 1:250.

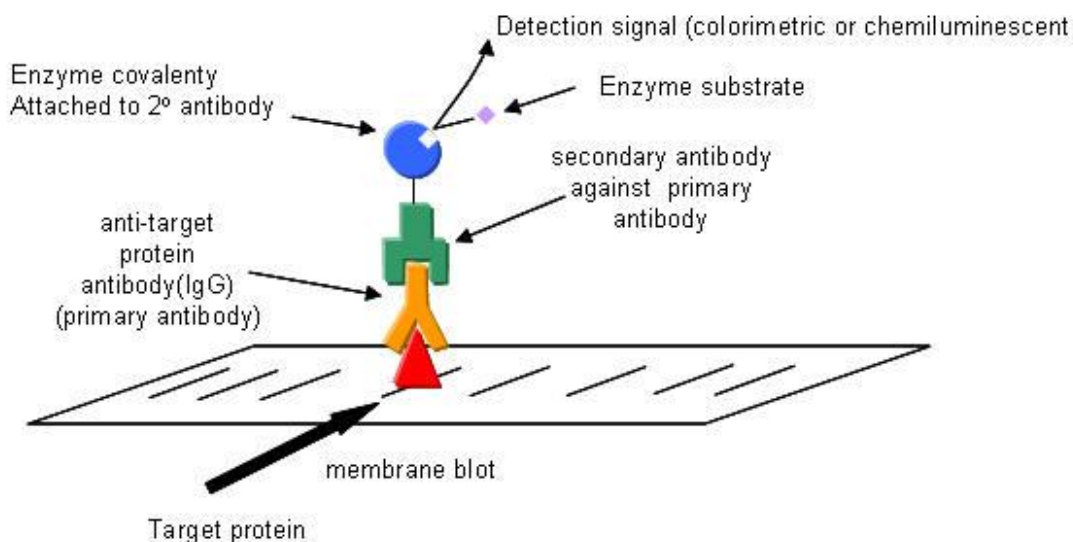
A seguito dell'incubazione vengono fatti 4 lavaggi da 10 minuti utilizzando la soluzione PBS-milk (ad un volume di circa 13mL per ciascun lavaggio), allo scopo di rimuovere l'anticorpo legatosi alla membrana in modo aspecifico.

Terminati i lavaggi la membrana viene incubata per un'ora con l'anticorpo secondario, a temperatura ambiente. Insieme all'anticorpo secondario, la cui funzione è quella di riconoscere l'anticorpo primario legato alle proteine specifiche, viene solubilizzata in PBS-milk anche l'anti-biotina, in diluizione 1:5000, in modo da legare e permettere la visualizzazione anche

della biotina presente nello standard. L'anticorpo secondario utilizzato è un anti-rabbit, diluito 1:10000, tranne che per il riconoscimento di IgJ, per cui la diluizione utilizzata è stata di 1:20000.

Terminata questa fase devono essere effettuati altri 4 lavaggi da 10 minuti con PBS-milk, a cui seguono 2 lavaggi con PBS da 5 minuti ciascuno ed infine l'ultimo lavaggio, da un minuto, con acqua.

La nitrocellulosa è stata quindi incubata al buio (coprendola con alluminio) per un minuto in 2mL di soluzione contenente Luminolo (ECL Kit, PerkinElmer), in modo da rivelarne le proteine.



Si trasferisce quindi su pellicola trasparente per poi procedere con l'acquisizione in chemiluminescenza con lo strumento ImageQuant LAS4010 (GE Health Care). Si intende per luminescenza l'emissione di radiazioni luminose nel ritorno di un atomo o di una molecola da un livello energetico maggiore ad uno minore; questa viene classificata in base allo stimolo che causa il passaggio dallo stato fondamentale a quello eccitato:

nel caso della chemiluminescenza tale causa è costituita da una reazione chimica.

L'intensità delle bande immunoreattive, cioè quelle relative alla proteina di interesse, è stata quantificata dal software "ImageQuant TL".

## Capitolo 4

### Risultati e discussione

Studi epidemiologici stimano una prevalenza di 12 mesi di dipendenza da alcol nel 2-4% della popolazione. L'abuso di alcol è una malattia molto diffusa che può portare ad una moltitudine di problemi sociali e di salute; non porta solo a danni a livello epatico ma è causa anche di insorgenza di cancro oltre che dell'aggravamento di altre patologie, come il diabete e i disturbi cardiovascolari.

Da un punto di vista sociale, l'abuso di alcool è strettamente correlato con una maggiore incidenza di incidenti stradali, aggressioni, problemi nell'ambito familiare, oltre che a problemi finanziari.

Si stima che a livello mondiale circa il 3,8% dei decessi e il 4,6% delle disabilità siano attribuibili all'alcol.

L'incapacità di valutare con precisione i comportamenti di un bevitore costituisce un ostacolo significativo per la diagnosi e il trattamento dell'alcolismo.

L'uso della saliva per la diagnosi di abuso di sostanze ha ricevuto una crescente attenzione negli ultimi anni, dal momento che essa contiene una vasta gamma di componenti che sono molto sensibili alle sostanze tossiche. Nel nostro laboratorio abbiamo esaminato l'applicabilità dell'utilizzo di un approccio proteomico su saliva al fine di ricercare potenziali biomarcatori dell'abuso di alcol. Lo studio preliminare è stato condotto su 10 alcolisti e

10 soggetti astemi. L'approccio utilizzato è stato quello dell'elettroforesi bidimensionale, per separare le proteine salivari, e la spettrometria di massa, per l'identificazione delle proteine ritenute di interesse dopo analisi comparativa delle due classi.

Un'immagine rappresentativa del profilo proteico di saliva dei soggetti astemio ed alcolista è riportata di seguito insieme alla tabella dove sono indicate le proteine di interesse con i dati di identificazione ottenuti dall'analisi nanoLC-ESI-MS/MS e le differenze di espressione.

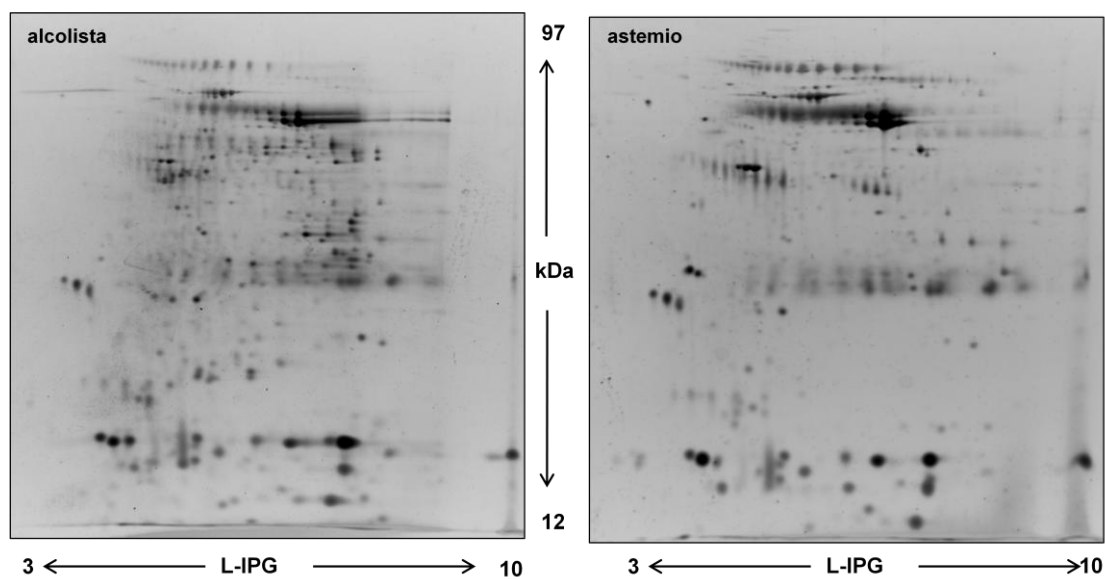


Figura 4. 1 Immagine rappresentativa del profilo proteico salivare di un paziente alcolista e di un soggetto astemio.



## Analisi proteomica della saliva in soggetti alcolisti.

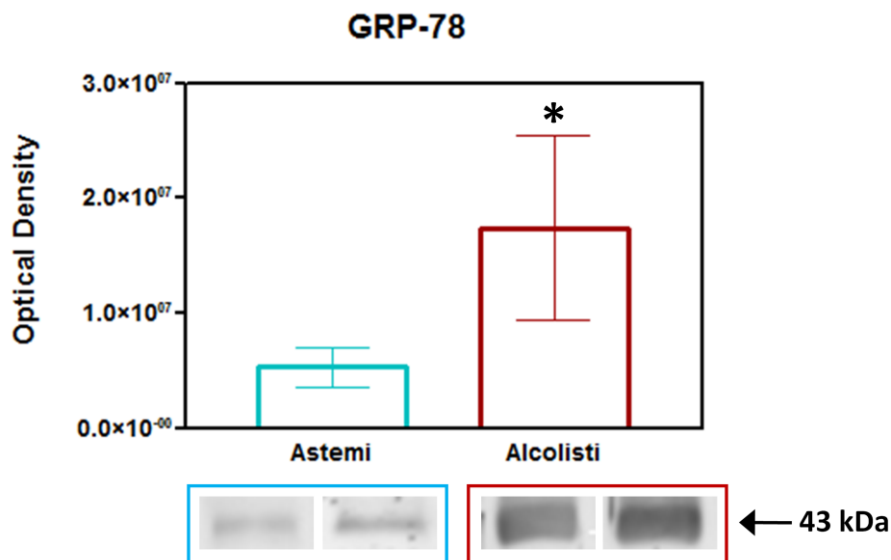
N° spot	Protein Name			ID	Gene Name	MW		pI		Matched peptides	Cov. (%)	Best Ion Score	Fold	p-value
						th	obs	th	obs					
Metabolism														
522	Alpha-enolase			P06733	ENO1	47	48	7,01	6,11	5	18	91,5	+2	0,0012
Signal transduction														
526	Rab inhibitor beta	GDP	dissociation	P50395	GDI2	50	48	6,1	5,96	5	14	68,7	+2	0,0257
Catalytic activity														
541	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			Q08188	TGM3	76	47	5,61	6,9	7	14	81,4	+3,3	0,0053
593	78 kDa protein	glucose-regulated		P11021	HSPA5	72	43	5,07	6,52	9	19	94,6	+3,6	0,0002
Immune response														
1263	Immunoglobulin J chain			P01591	IGJ	18	30	5,09	4,5	5	29	51,4	-2	0,0019
2686	Ig kappa chain C region			P01834	IGKC	11	32	5,58	7,9	3	48	76	-2	0,0098
Ion transport														
1575	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin			P80188	LCN2	23	25	9,02	5,86	2	12	62,2	+2,1	0,0002
Inflammatory response														
1853	Protein S100-A9			P06702	S100A9	13	22	5,71	5,84	3	32	71,8	+3	0,0028
1877	Cystatin-A			P01040	CSTA	11	21	5,38	5,32	2	31	45	+2	0,0309
Others														
537	Alpha-amylase 1			P04745	AMY1A	58	47	6,47	7,2	8	22	105,9	+3	0,0065
579	Alpha-amylase 1			P04745	AMY1A	58	45	6,47	7,21	10	26	102,6	+3,3	0,0001
2026	Prolactin-inducible protein			P12273	PIP	17	19	8,26	4,82	2	15	77,2	+2,2	0,0202

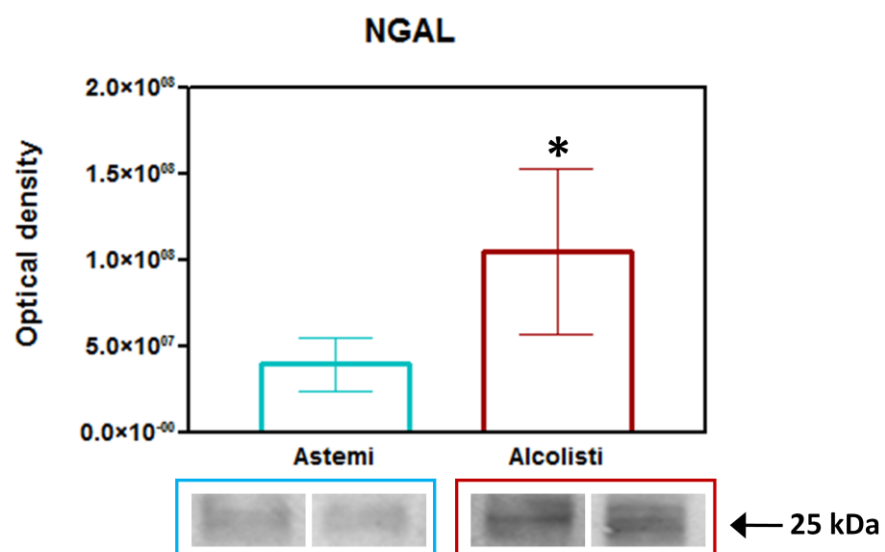
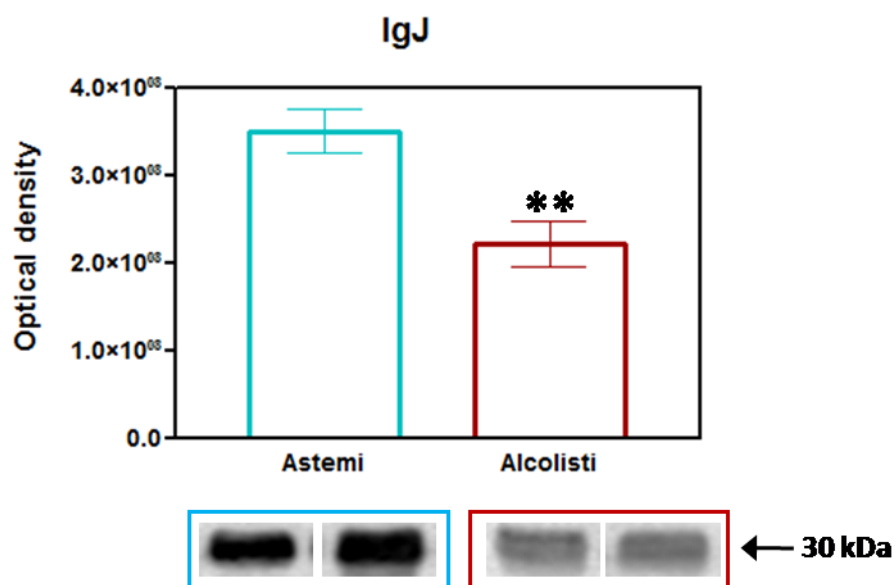
**Figura 4. 2 Tabella riportante le proteine d'interesse ed i relativi dati. Sono evidenziate in giallo le proteine di cui è stata effettuata la validazione.**

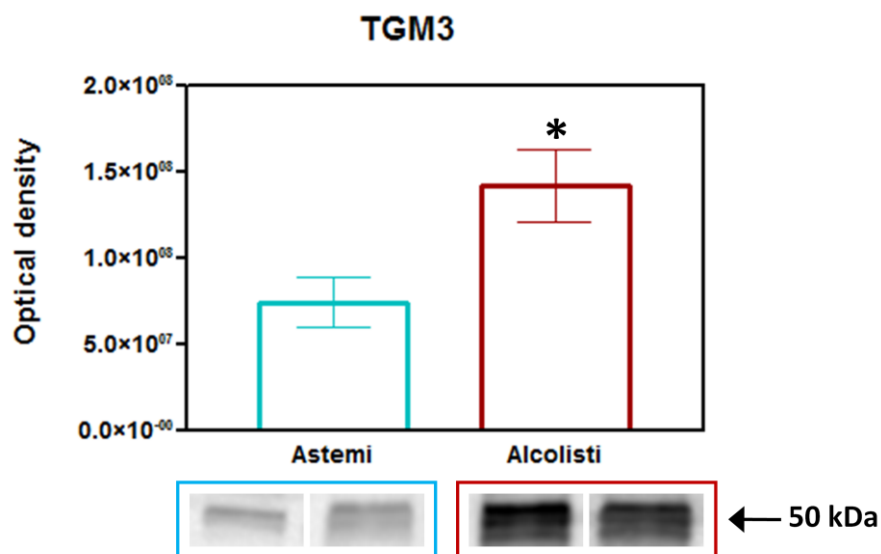
Oggetto del mio lavoro di tesi è stato quello di validare le differenze di espressione ottenute per le proteine di maggior interesse, utilizzando anticorpi specifici ed analisi western blot. In tabella sono evidenziate le proteine sulle quali ho condotto l'analisi e più precisamente: IgJ, GRP-78, NGAL e TGM3.

La validazione è stata condotta su un numero maggiore di campioni, per l'esattezza 22 alcolisti e 15 astemi. Tutti gli alcolisti hanno compilato un questionario dove hanno riportato informazioni relative alla loro storia di abuso da alcool e da eventuali altre sostanze. I soggetti con malattie croniche o virali contagiose sono stati poi esclusi dallo studio.

Di seguito sono riportate le immagini delle immunoreazioni ottenute per alcuni campioni rappresentativi di astemi e alcolisti, con l'istogramma corrispondente ottenuto dall'analisi di tutti i campioni processati e i valori di significatività ottenuti dai confronti dopo analisi non parametrica con Mann Whitney.







I risultati ottenuti confermano sia l'andamento di espressione delle singole proteine in senso di up- o down-regulation, che il valore nella differenza di espressione, con incrementi significativi di circa 2-3 volte nei campioni di alcolisti rispetto agli astemi per GRP-78, NGAL e TGM3 e riduzione di espressione dell'ordine di due volte della catena IgJ ( $p=0.0043$ ).

Da un punto vista funzionale GRP-78 è un membro della famiglia delle Hsp70 ed è una chaperonina del reticolo endoplasmico coinvolta nel corretto avvolgimento delle proteine nascenti. Questa proteina è stata implicata anche nella presentazione non classica dell'antigene e nella regolazione delle risposte citotossiche della cellula T; sembra anche essere un marcatore dello stato di stress della cellula, dal momento che sotto condizioni di stress migra dal reticolo alla superficie cellulare. Infine è stato osservato che questa proteina può essere secreta nello spazio extracellulare.

In uno studio molto recente volto a valutare l'effetto indotto dal trattamento cronico con etanolo su colture di cellule neuronali, Romero e collaboratori [107] hanno dimostrato la presenza di alterazioni sia qualitative che quantitative a livello delle vie di secrezione cellulari, incluso il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, il citoscheletro e la membrana plasmatica. In particolare dopo esposizione cronica ad etanolo gli autori dimostrano alterazioni della densità e del volume del compartimento del reticolo ed un incremento di espressione della proteina GRP-78, quale chaperonina coinvolta nello stress del reticolo stesso. Gli autori concludono che a livello di cellule neuronali l'esposizione cronica ad etanolo produrrebbe alterazioni nelle proteine di trasporto cellulari, influenzando negativamente lo sviluppo ed il mantenimento della morfologia e della polarizzazione cellulare. L'aumento di espressione riscontrato nella saliva degli alcolisti potrebbe essere interpretato come una risposta ad uno stato di stress indotto dall'alcool sulle proteine cellulari. Nel nostro caso però il fatto di ritrovare un incremento di espressione di un frammento proteolitico di questa proteina (43 kDa) suggerisce che la situazione dell'alcolista produce un aumento di degradazione della proteina che svolge meno il suo ruolo protettivo di risposta a stress da abuso di alcol.

Per quanto riguarda le transglutaminasi sono un'ampia famiglia di enzimi ubiquitari che catalizzano la modificazione post-trasduzionale di proteine, catalizzando un cross-linking tra un residuo di glutamina di una proteina e un residuo di lisina di un'altra o della stessa. Il genoma umano codifica nove membri della famiglia delle transglutaminasi. In particolare TGM3 è espressa a livello epiteliale nei cheratinociti ed è coinvolta nella fase finale di differenziamento. TGM3 viene espressa nella forma inattiva (PM pari a

77 kDa), che viene tagliata in un frammento N-terminale di 50kDa contenente il sito attivo e uno di 27 kDa C-terminale che rimane associato alla forma matura. Nei nostri campioni di saliva ritroviamo una differenza di espressione della forma attiva di 50 kDa, che risulta up-regolata negli alcolisti. Un ruolo attivo di TGM3 nello sviluppo della pellicola della mucosa è stato avanzato da Gibbins e collaboratori [108] nella prevenzione del danno ai tessuti molli. Possiamo quindi ipotizzare che aumentate concentrazioni di TGM3 in forma attiva nella saliva di alcolisti possano essere una risposta al danno locale indotto dall'alcol. Sicuramente potrebbe essere d'interesse la correlazione tra l'espressione di questa proteina con la quantità di alcool assunto e la tipologia, in modo che questo enzima possa diventare un marcatore precoce per l'abuso da alcool.

Mentre TGM3 potrebbe essere un indicatore di danno precoce da abuso da alcol a livello della cavità orale, le aumentate espressioni di NGAL trovate nella saliva degli alcolisti potrebbero essere precoci indicatori di un danno in atto a livello renale o epatico. NGAL è una proteina che lega il ferro coinvolta in molteplici processi cellulari quali apoptosi, immunità innata e sviluppo renale. Aumentati livelli di NGAL nel siero o nelle urine sono stati ritrovati in pazienti con cirrosi secondaria a epatite C e abuso di alcool o danno acuto a livello renale [109].

In conclusione, si può ragionevolmente affermare che lo studio della proteomica salivare nel caso di soggetti dediti al consumo di alcol può dare utili informazioni sui diversi aspetti legati al danno prodotto sia a livello sistemico che localmente, a livello della mucosa orale. Studi ulteriori sono necessari per valutare il rapporto tra le alterazioni osservate nelle proteine salivari e il tipo e la quantità di alcol assunto. Questo potrebbe essere utile

per valutare l'efficacia dei trattamenti per la disassuefazione da abuso di alcol, per effettuare diagnosi nell'ambito dei disordini derivanti da tale abuso, per verificare o anche sostituire i questionari auto-redatti dai pazienti (che costituiscono ancora oggi il principale strumento per la diagnosi, nonostante gli evidenti limiti), così come per monitorare l'astinenza in soggetti ad alto rischio per motivi di salute o di pubblica sicurezza.

## Bibliografia:

1. [https://www.ars.toscana.it/files/aree\\_intervento/alcol/news/who\\_status-report-on-alcohol-and-health-in-35-european-countries.pdf](https://www.ars.toscana.it/files/aree_intervento/alcol/news/who_status-report-on-alcohol-and-health-in-35-european-countries.pdf)
2. Schiller JS, Lucas JW, Peregoy JA. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2011. *Vital Health Stat.* 2012; 10 (256). Available from: [www.cdc.gov/nchs/data/series/sr\\_10/sr10\\_256.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_10/sr10_256.pdf)
3. <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>
4. Robin C. Wackernah, Matthew J Minnick, Peter Clapp. Alcohol use disorder: pathophysiology, effects, and pharmacologic options for treatment. *Substance Abuse and Rehabilitation* 2014.
5. Niladri Banerjee. Neurotransmitters in alcoholism: a review of neurobiological and genetic studies. *Indian journal of Human Genetics*, 2014.
6. Ji D, Gilpin NW, Richardson HN, Rivier CL, Koob GF. Effects of naltrexone, duloxetine, and a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist on binge-like alcohol drinking rats. *Behav Pharmacol.* 2008; 19:1-12.
7. Koob GF. Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27:232-43.
8. Hodge CW, Samson HH, Cappelle AM. Alcohol self-administration: Further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997;21:1083-91.
9. Rassnick S, Pulvirenti L, Koob GF. Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;109:92-8.
10. Weiss F, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus



- accumbens: Genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267:250-8.
11. Rassnick S, Stinus L, Koob GF. The effects of 6-hydroxidopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat. *Brain Res.* 1993;623:16-24.
  12. Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, et al. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: Possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci.* 2007;27:12700-6.
  13. Cui C, Noronha A, Morikawa H, et al. New insights on neurobiological mechanisms underlying alcohol addiction. *Neuropharmacology.* 2013;67:223-232.
  14. Lovinger DM, Roberto M. Synaptic effects induced by alcohol. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;13:31-86.
  15. Virkkunen M, Linnoila M. Serotonin in early onset, male alcoholics with violent behaviour. *Ann Med.* 1990;22:327-31.
  16. Johnson BA. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: Scientific basis and clinical findings. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:34-56.
  17. Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytiä P, Lorang MT, Bloom FE, et al. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci.* 1996;16:3474-85.
  18. Koob GF. A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1515-25.
  19. Hyytiä P, Koob GF. GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol.* 1995;283:151-9.
  20. Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2053-8.

21. June HL, Foster KL, McKay PF, Seyoum R, Woods JE, Harvey SC, et al. The reinforcing properties of alcohol are mediated by GABA (A1) receptors in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:2124-37.
22. Biggio G, Concas A, Follesa P, Sanna E, Serra M. Stress, ethanol and neuroactive steroids. *Pharmacol Ther*. 2007;116:140-71.
23. Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, et al. Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci*. 2004;24:6521-30.
24. Carboni S, Isola R, Gessa GL, Rossetti ZL. Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. *Neurosci Lett*. 1993;152:133-6.
25. Giplin NW, Koob GF. Neurobiology of alcohol dependence: Focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res Health*. 2008;31:185-95.
26. Roberto M, Schweitzer, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: An *in vitro* and *in vivo* analysis. *J Neurosci*. 2004;24:1594-603.
27. Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*. 1989;243:1721-4.
28. Blednov YA, Harris RA. Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulation of ethanol sedation, dependence and consumption: relationship to acamprosate actions. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11:775-93.
29. Pulvirenti L, Diana M. Drug dependence as a disorder of neural plasticity: Focus on dopamine and glutamate. *Rev Neurosci*. 2001;12:141-58.
30. Palmer RH, McGeary JE, Francazio S, et al. The genetics of alcohol dependence: advancing towards system-based approaches. *Drug Alcohol Depend*. 2012;125(3):179-191.
31. Prasad P, Ambekar A, Vaswani M. Dopamine D2 receptor polymorphisms and susceptibility to alcohol dependence in Indian males: a preliminary study. *BMC Med Genet*. 2010;11-24.

32. Konishi T, Luo HR, Calvillo M, Mayo MS, Lin KM, Wan YJ. ADH1B\*1, ADH1C\*2, DRD2 (-141C Ins), and 5-HTTLPR are associated with alcoholism in Mexican American men living in Los Angeles. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28:1145-52.
33. Dick DM, Plunkett J, Wetherill LF, Xuei X, Goate A, Hesselbrock V, et al. Association between GABRA1 and drinking behaviors in the collaborative study on the genetics of alcoholism sample. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30:1101-10.
34. Park CS, Park SY, Lee CS, Sohn JW, Hahn GH, Kim BJ. Association between alcoholism and the genetic polymorphisms of the GABAA receptor genes on chromosome 5q33-34 in Korean population. *J Korean Med Sci.* 2006;21:533-8.
35. Chang YT, Sun HS, Fann CS, Chang CJ, Liao ZH, Huang JL, et al. Association of the gamma-aminobutyric acid A receptor gene cluster with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Mol Psychiatry.* 2002;7:828-9.
36. Song J, Koller DL, Foroud T, Carr K, Zhao J, Rice J, et al. Association of GABA (A) receptors and alcohol dependence and the effects of genetic imprinting. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003; 117B:39-45.
37. Domart MC, Benyamina A, Lemoine A, Bourgain C, Blecha L, Debuire B, et al. Association between a polymorphism in the promoter of a glutamate receptor subunit gene (GRIN2A) and alcoholism. *Addict Biol.* 2012;17:783-5.
38. <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/alcohol-use-disorders/genetics-alcohol-use-disorders>
39. C.L. Galli, E. Corsini, M. Marinovich *Tossicologia* II ed. Piccin.
40. Krenz M, Korthuis RJ. Moderate ethanol ingestion and cardiovascular protection: from epidemiologic associations to cellular mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(1):93-104.
41. Roerecke M, Rehm J. The cardioprotective association of average alcohol consumption and ischaemic heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Addiction.* 2012;107(7):1246-1260.

42. Greenspon AJ, Schaal SF. The “holiday heart”: electrophysiologic studies of alcohol effects in alcoholics. *Ann Intern Med.* 1983;98(2):135-139.
43. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Fetal alcohol exposure.  
<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/FASDFactsheet/FASD.pdf>
44. Klintsova, A.Y.; Scamra, C.; Hoffman, M.; et al. Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats: II. A quantitative stereological study of synaptic plasticity in female rat cerebellum. *Brain Research* 937:83–93, 2002.
45. Chen, S.Y.; Wilkemeyer, M.F.; Sulik, K.K.; and Charness, M.E. Octanol antagonism of ethanol teratogenesis. *FASEB Journal* 15:1649–1651, 2001.
46. Spong, C.Y.; Abebe, D.T.; Gozes, I.; et al. Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297:774–779, 2001.
47. Thomas, J.D.; Fleming, S.L.; and Riley, E.P. Administration of low doses of MK–801 during ethanol withdrawal in the developing rat pup attenuates alcohol’s teratogenic effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26(8):1307–1313, 2002.
48. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.  
<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa63/aa63.htm>
49. Victor, M.; Davis, R.D.; and Collins, G.H. *The Wernicke–Korsakoff Syndrome and Related Neurologic Disorders Due to Alcoholism and Malnutrition*. Philadelphia: F.A. Davis, 1989.
50. Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 2008;154(2):299-315.
51. Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1992;369:15-26.

52. Weiss RD, Cogley C. Pharmacotherapy of alcohol dependence: how and when to use disulfiram and naltrexone. *Curr Psychiatr.* 2002;1(2):51-60.
53. Fuller RK, Branchey R, Brightwell DR, et al. Disulfiram treatment of alcoholism. A veteran administration cooperative study. *JAMA.* 1986; 256(11):1449-1455.
54. Yoshimura A, Kimura M, Nakayama H, et al. Efficacy of disulfiram for the treatment of alcohol dependence assessed with a multicenter randomized controlled trial. *Alcohol Clin Exp Res.* Epub Oct 11, 2013.
55. Mutschler J, Dirican G, Funke S, et al. Experienced acetaldehyde does not improve treatment response in outpatients treated with supervised disulfiram. *Clin Neuropharmacol.* 2011;34(4):161-165.
56. Mutschler J, Dirican G, Gutzeit A, Grosshans M. Safety and efficacy of long-term disulfiram aftercare. *Clin Neuropharmacol.* 2011;34(5):195-198.
57. De Witte P, Littleton J, Parot P, Koob G. Neuroprotective and abstinence-promoting effects of acamprosate: elucidating the mechanism of action. *CNS Drugs.* 2005;19(6):517-537.
58. Kranzler HR, Gage A. Acamprosate efficacy in alcohol dependent patients: summary of results from three pivotal trials. *Am J Addict.* 2008;17(1):70-76.
59. Yahn SL, Watterson LR, Olive MF. Safety and efficacy of acamprosate for the treatment of alcohol dependence. *Subst Abuse.* 2013;6:1-12.
60. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. <http://www.niaaa.nih.gov/research/major-initiatives/medications-development-program>
61. Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):659-666.
62. Anton RF, Kranzler H, Breder C, Marcus RN, Carson WH, Han J. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and safety of aripiprazole for the treatment of alcohol dependence. *J Clin Psychopharmacol.* 2008;28(1):5-12.

63. Voronin K, Randall P, Myrick H, Anton R. Aripiprazole effects on alcohol consumption and subjective reports in a clinical laboratory paradigm – possible influence of self-control. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(11):1954-1961.
64. Hutchison KE, Wooden A, Swift RM, et al. Olanzapine reduces craving for alcohol: A DRD4 VNTR polymorphism by pharmacotherapy interaction. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(10):1882-1888.
65. Guardia J, Segura L, Gonzalvo B, et al. A double-blind, placebo-controlled study of olanzapine in the treatment of alcohol-dependence disorder. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(5):736-745.
66. Moallem N, Ray LA. Quetiapine improves response inhibition in alcohol dependent patients.: a placebo-controlled pilot study. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;100(3):490-493.
67. Kampman KM, Pettinati HM, Lynch KG, et al. A double-blind, placebo-controlled pilot trial of quetiapine for the treatment of Type A and Type B alcoholism. *J Clin Psychopharmacol.* 2007;27(4):344-351.
68. Naranjo CA, Knoke DM, Bremner KE. Variations in response to citalopram in men and women in alcohol dependence. *J Psychiatry Neurosci.* 2000;25(3):269-275.
69. Balldin J, Berggren U, Engel J, Eriksson M, Hard E, Soderpalm B. Effect of citalopram in alcohol intake in heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(5):1133-1136.
70. Pettinati HM, Volpicelli JR, Kranzler HR, Luck G, Rukstalis MR, Cnaan A. Sertraline treatment for alcohol dependence: interactive effects of medication and alcoholic subtype. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(7):1041-1049.
71. Brower KJ, Myra Kim H, Strobbe S, Karam-Hage MA, Consens F, Zucker RA. A randomized double-blind pilot trial of gabapentin versus placebo to treat alcohol dependence and comorbid insomnia. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(8):1429-1438.

72. Furieri FA, Nakamura-Palacios EM. Gabapentin reduces alcohol consumption and craving: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2007;68(11):1691-1700.
73. Anton RF, Myrick H, Wright TM, et al. Gabapentin combined with naltrexone for the treatment of alcohol dependence. *Am J Psychiatry*. 2011;168(7):709-717.
74. Baltieri DA, Darò FR, Ribeiro PL, de Andrade AG. Comparing topiramate with naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Addiction*. 2008;103(12):2035-2044.
75. Croissant B, Diehl A, Klein O, et al. A pilot study of oxcarbazepine versus acamprosate in alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(4):630-635.
76. Martinotti G, Di Nicola M, Romanelli R, et al. High and low dosage oxcarbazepine versus naltrexone for the prevention of relapse in alcohol-dependent patients. *Hum Psychopharmacol*. 2007;22(3):149-156.
77. Brady KT, Myrick H, Henderson S, Coffey SF. The use of divalproex in alcohol relapse prevention: a pilot study. *Drug Alcohol Depend*. 2002;67(3):323-330.
78. Addolorato G, Caputo F, Capristo E, et al. Baclofen efficacy in reducing alcohol craving and intake: a preliminary double-blind randomized controlled study. *Alcohol Alcohol*. 2000;37(5):504-508.
79. Addolorato G, Leggio L, Ferrulli A, et al. Dose-response effect of baclofen in reducing daily alcohol intake in alcohol dependence: secondary analysis of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alcohol Alcohol*. 2011;46(3):312-317.
80. Sellers EM, Toneatto T, Romach MK, Somer GR, Sobell LC, Sobell MB. Clinical efficacy of the 5-HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron in alcohol abuse and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18(4):879-885.
81. Simpson TL, Saxon AJ, Meredith CW, et al. A pilot trial of the alpha-1 adrenergic antagonist, prazosin, for alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(2):255-263.
82. Fox HC, Anderson GM, Tuit K, et al. Prazosin effects on stress- and cue-induced craving and stress response in alcohol-dependent



- individuals: preliminary findings. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(2):351-360.
83. Penetar DM, Toto LH, Farmer SL, et al. The isoflavone puerarin reduces alcohol intake in heavy drinkers: a pilot study. *Drug Alcohol Depend*. 2012;126(1-2):251-256.
  84. Lukas SE, Penetar D, Su Z, et al. A standardized kudzu extract (NPI-031) reduces alcohol consumption in non treatment-seeking male heavy-drinkers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;226(1):65-73.
  85. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 1996; 17: 443- 444.
  86. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, and Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16:1090-1094.
  87. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, and Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev* 1995; 13: 19-50
  88. Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 39-46.
  89. Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 267-293.
  90. Stults JT, Arnott D. Proteomics. *Methods in enzymology* 2005; (402): 245-278.
  91. Godovac-Zimmermann J, Soskic V, Poznanovic S, Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20 (4-5): 952-961.
  92. Imam-Sghiouar N, Laude-Lemaire I, Labas V, Pflieger D, Le Caer JP, Caron M, Nabias DK, Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2 (7): 828-838.



93. Choudhary J, Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5 (7): 440-445.
94. Mariana P Torrente, Willard M Freeman, Kent E Vrana. Proteine biomarkers of alcohol abuse. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(4):425-436.
95. Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, Snyder M, Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
96. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
97. Herbert BR et al. What place for polyacrylamide in proteomics?. *Trends Biotechnol* 2001; 19: S3-S9.
98. Greenfield TK, Ye Y, Kerr W, Bond J, Rehm J, Giesbrecht N. Externalities from alcohol consumption in the 2005 US National Alcohol Survey: implication for policy. *Int J Environ Res Public Health*. 2009; 6(12):3205-3224.
99. Harwood HJ, Fountain D, Livermore G. Economic costs of alcohol abuse and alcoholism. *Recent Dev Alcohol*. 1998;14:307-330.
100. Ministero della salute  
[http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1\\_5.jsp?lingua=italiano&id=86&area=Disturbi\\_psichici](http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?lingua=italiano&id=86&area=Disturbi_psichici)
101. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009; 373(9682):2223–2233. [PubMed: 19560604]
102. Freeman WM, Vrana KE. Future prospects for biomarkers of alcohol consumption and alcohol-induced disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34(6):946–954. [PubMed: 20374220]
103. Biomarkers Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69(3):89–95. Commentary from an NIH-sponsored working group that provided important guidance and definitions on biomarker development, evaluation and validation. [PubMed: 11240971]

104. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res.* 2010; 89(10):1016-1023.
105. Pascali J, Neri C, Tagliaro F. La strategia analitica tossicologico-forense negli accertamenti sull'idoneità alla guida. [www.drugsonstreet.it](http://www.drugsonstreet.it)
106. Kaufman E, Lamster Ira B. The diagnostic application of saliva - a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
107. Romero AM1, Renau-Piqueras J, Marín MP, Esteban-Pretel G. Chronic Alcohol Exposure Affects the Cell Components Involved in Membrane Traffic in Neuronal Dendrites. *Neurotox Res.* 2014.
108. HL Gibbins , GB Proctor , GE Yakubov , S Wilson , GH Carpenter. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. *Oral Dis.* 2014; 20(7):707-13.
109. Justin M. Belcher, Chirag R. Parikh, Guadalupe Garcia-Tsao. Acute Kidney Injury in Patients With Cirrhosis: Perils and Promise. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013; 11(12):1550-8.

## ***Ringraziamenti***

*Un grande ringraziamento va innanzitutto al Prof. Lucacchini, alla Dott.ssa Laura Giusti, alle Dott.sse Federica Ciregia e Ylenia Da Valle, senza dimenticare Mario e Isabella, per avermi seguita, aiutata e incoraggiata durante l'esperienza di laboratorio che ha portato a questa tesi, oltre che nella stesura stessa. Grazie per la vostra pazienza e dedizione.*

*Voglio ringraziare la mia famiglia, per avermi dato la possibilità di studiare innanzitutto, ma soprattutto per avermi sopportata e supportata anche nei momenti più difficili. Senza di voi, davvero, tutto questo non sarebbe stato possibile.*

*Ringrazio anche Lorella e Lisa, per essere la mia seconda famiglia, anche se ormai da un po' la famiglia è praticamente una sola e ne sono felice.*

*Ringrazio i miei compagni di corso: ho conosciuto persone meravigliose, che sono state fondamentali nel mio percorso universitario, ma che mi hanno anche dato tanto al di fuori. Un ringraziamento particolare va inevitabilmente alle mie stupende amiche, con cui ho condiviso tanto: Elena, Elisa e Valeria.*

*Il ringraziamento più grande però va a Luca, per il sostegno fondamentale ed i consigli durante tutto il mio percorso, compresa l'elaborazione di questa tesi, oltre che per mille altri motivi che lui conosce perfettamente e che sarebbero troppi da elencare. Tra questi però forse quello più importante è il fatto che mi ha insegnato a cercare e a trovare la poesia in ogni giorno e in ogni singola cosa che faccio. Grazie.*

